

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Imunologia e DIP / Genética e Biotecnologia

Annelisa Farah da Silva

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DA
PROPRIEDADE ANTIADERENTE DO XILITOL**

Juiz de Fora
2010

Annelisa Farah da Silva

**Avaliação *in-vitro* da atividade antimicrobiana
e da propriedade antiaderente do xilitol**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nádia Rezende Barbosa Raposo
Co-orientador: Prof. Dr. Murilo Gomes de Oliveira

Juiz de Fora
2010

Annelisa Farah da Silva

**Avaliação *in-vitro* da atividade antimicrobiana e da propriedade antiaderente
do xilitol**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética e Biotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 5 de julho de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Nádia Rezende Barbosa Raposo (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Carla Christine Lange
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Murilo Gomes de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

“O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem, mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que ele faz existir.”
(Albert Einstein)

“Não há felicidade sem amor, vida sem sonhos, vitória sem luta.”
(Armando de Almeida)

“Vocês, jovens doutores e cientistas do futuro, não se deixem macular por um ceticismo estéril e nem sejam desencorajados pela tristeza que as nações passam em certas horas. Não fiquem bravos com seus adversários. Nenhuma teoria científica já foi aceita sem oposição. Vivam na paz de suas bibliotecas e laboratórios. Perguntem-se antes: ‘O que fiz pela minha instrução?’ E ao avançarem gradualmente: ‘O que estou conseguindo?’ Até que chegue a hora que terão a imensa felicidade de pensar que contribuíram de algum modo para o bem-estar e progresso da humanidade.”
(Louis Pasteur)

Dedico este trabalho aos meus pais, Artur e Cristina, que estiveram sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando diante das dificuldades. Pelo carinho, ajuda e amor incondicionais, o meu eterno agradecimento.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, pelas oportunidades e por sempre iluminar meu caminho. Pela força concedida durante todo este trabalho, permitindo alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Artur e Cristina, que acreditaram em mim e dedicam toda sua vida em prol da minha formação pessoal e profissional, dando-me suporte para a conclusão desse curso. Agradeço pela criação, incentivo, amor, e apoio que foram e são, para mim, indispensáveis!

A minha irmã Cissa, pelo carinho, amizade e compreensão. Pelos momentos de descontração e alegria que você proporciona como ninguém!

A toda a minha família, em especial, aos meus avós Abdo e Ninita, e avó Ernesta (presente em meu coração), como exemplos de vida e de luta. Vocês abriram todas as portas para minhas conquistas e realizações!

Ao meu amor, Tide, pela companhia, compreensão e incentivo constantes. Pelo amor dedicado, enorme paciência, alegrias infinitas e por ter me acompanhado e ajudado diretamente na realização deste trabalho, até mesmo se arriscando em alguns experimentos. Obrigada por estar sempre ao meu lado!

À Prof^a Dr^a Nádia, minha orientadora, por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade de desenvolver este estudo. Pelos ensinamentos constantes, valiosas conversas, divertidas viagens e agradável convívio. Nunca me esquecerei de toda sua contribuição para meu amadurecimento acadêmico e pessoal!

Ao Prof. Dr. Murilo, meu co-orientador, por acreditar no meu trabalho. Pela ajuda, atenção e pela doação das cepas clínicas utilizadas nessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Sílvio por apoiar nossas ideias. Pelos ensinamentos durante a especialização e o mestrado, e, por fornecer gentilmente o xilitol utilizado nesta pesquisa.

À Prof^a Dr^a Rita, à Prof^a Msc. Maria Helena, e à Prof^a Dr^a. Elizabeth pela confiança depositada em mim, e, por terem me acolhido durante a faculdade e após a formatura. Por terem aberto o meu caminho para vida acadêmica, pelas conversas no corredor e por estarem sempre preocupadas e me incentivando...

Aos professores da PGC BIO, especialmente, Prof^a Dr^a Cíntia, Prof^a Dr^a Priscila, Prof^a Dr^a Ana Paula e Prof. Dr. Marcelo, pelos conhecimentos transmitidos em aula e por sempre me ajudarem, prontamente, com valiosos ensinamentos e conselhos para a

dissertação, projetos e planos futuros....

À Prof^ª. Francine, minha professora de inglês, pelos ensinamentos, conversas e ajuda direta neste trabalho.

À Laura, secretária da PGCBIO, que se tornou uma grande amiga, pelas conversas constantes, momentos de risadas e valiosas dicas.

À Noêmia Rodrigues, do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer – UFRJ, pelo auxílio nas análises de MEV, pelas constantes trocas de e-mails e pelo carinho e atenção com que sempre me recebeu....

À Josiane Conti, da Coleção de Culturas Tropical - Fundação André Tosello, pela atenção e pela doação das cepas ATCC utilizadas neste estudo.

Aos amigos do mestrado, Fernanda, Lauren, Josi, Liana, Karla, Carol, Felipe, Osmar, Rita e Juliana, por estarmos sempre juntos! Pelas ajudas durante as matérias, pela preocupação com meus experimentos, por me entenderem nos momentos de fraqueza e pelas conversas, trocas de conhecimento e incentivo...

Aos meus amigos, que não estavam diretamente relacionados ao mestrado, pela amizade, torcida e por entenderem minhas ausências.

Aos amigos do NIQUA (FFB/UFJF), especialmente, Fatinha, Aline, Natália, Érika, Ana Paula, Letícia, César, Renata, Alessandra, Felipe Chaves, Vitor, Pedro, Lucas, Alexandre, Karla, Raquel, Gustavo, Fernanda, Thamires, Rafael, Augusto e Felipe Abdo, pelo convívio, amizade e auxílio tanto nos momentos de bancada quanto nos momentos de publicações e trabalhos de congressos...

À amiga Aline, pelos treinamentos e ajuda nos ensaios, publicações, análises estatísticas e redação da dissertação. Pelas conversas e conselhos importantes e por estar sempre disposta e disponível para me ajudar. Seus ensinamentos e apoio foram imprescindíveis durante toda minha trajetória acadêmica. Muito obrigada!

À amiga Natália, pela calma que me transmite, pelas agradáveis conversas, pelas importantes ajudas com o preparo de materiais, ensaios e documentos. Por saber me escutar, aconselhar e nunca ter deixado de me ajudar. Seu apoio foi fundamental para esta conquista!

Ao pessoal do Laboratório de Alimentos (FFB/UFJF) por me permitirem utilizar a infraestrutura do laboratório. Em especial, à Nilza, pela grande ajuda com as vidrarias.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

A TODOS VOCÊS MINHA ETERNA GRATIDÃO!

RESUMO

Recentes pesquisas demonstram que o xilitol, além de poder ser utilizado como um ingrediente alimentar, possui várias aplicações clínicas, sendo indicado para tratar diabetes, lesões renais e parenterais, bem como para prevenir otite, cáries dentárias, infecções pulmonares e osteoporose. Na literatura científica, há alguns relatos da atuação antiaderente do xilitol sobre diversas bactérias. Atualmente, com a emergência de microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais, torna-se essencial a intensificação de pesquisas de novas estratégias para se prevenir e/ou tratar doenças ocasionadas pela presença destes patógenos. Uma abordagem promissora se baseia no conhecimento da aderência de microrganismos a diferentes superfícies, tanto no hospedeiro (*in vivo*) quanto em materiais médico-hospitalares, e de mecanismos que possam impedir essa colonização. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e a propriedade antiaderente do xilitol frente às cepas bacterianas *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* clínica (EPEC), *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Shigella flexneri* clínica e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Foram realizados o teste de atividade antimicrobiana, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), e o teste de aderência, no qual os parâmetros: crescimento no meio de cultivo, número de unidades formadoras de colônias desprendidas e avaliação das lamínulas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram analisados. Foi constatado que o xilitol, nas concentrações 0,5%; 2,5% e 5,0%, não possui atividade antimicrobiana sobre as cepas testadas. No entanto, foi demonstrada a inibição da aderência tanto pelas contagens dos bacilos desprendidos quanto pelas microfotografias obtidas por MEV. Para as concentrações de xilitol 0,5%; 2,5% e 5,0% foram desprendidos, respectivamente, 89 ± 6 ; 187 ± 12 e 257 ± 30 bacilos (*E.coli* ATCC 8739); 198 ± 28 ; 282 ± 20 e 311 ± 30 bacilos (*E.coli* clínica - EPEC); 65 ± 4 ; 23 ± 2 e 31 ± 1 bacilos (*S. enterica* sorotipo Typhimurium clínica); 131 ± 3 ; 120 ± 6 e 58 ± 6 bacilos (*S. flexneri* ATCC 12022); 779 ± 15 ; 146 ± 2 e 56 ± 6 bacilos (*S. flexneri* clínica); 2259 ± 130 ; 2990 ± 130 e 5330 ± 0 bacilos (*P. aeruginosa* ATCC 9027). Para todas as cepas testadas, os resultados revelaram que a inibição da aderência microbiana, observada nas lamínulas tratadas com xilitol, é provavelmente o mecanismo de ação deste composto. Este trabalho confere ao xilitol um maior valor agregado, torna-se uma biomolécula adequada para ser usada como adjuvante terapêutico para a prevenção e/ou tratamento de uma série de infecções recorrentes.

Palavras-chave: Aderência bacteriana. Bactérias. Prevenção e Controle. Xilitol.

ABSTRACT

Recent researches show that xylitol, besides being used as a food ingredient, has many clinical applications, being used to treat diabetes, renal and parenteral lesions, as well as to prevent otitis media, caries, lung infections and osteoporosis. In the scientific literature, there are some reports on the anti-adherent action of xylitol on many bacteria. Currently, with the emergence of microorganisms resistant to conventional antibiotics, research for new strategies is necessary, aiming at preventing and/or treating diseases caused by the presence of such pathogens. A very promising approach is based on the awareness of the adherence of microorganisms to several surfaces, both in the host (*in vivo*) and in medical-hospital materials, and of the mechanisms which may prevent such colonization. The present study aimed at evaluating the antimicrobial activity and the anti-adherent property of xylitol on the bacterial strains *Escherichia coli* (ATCC 8739), clinical *Escherichia coli* (EPEC), clinical *Salmonella enterica* serotype Typhimurium, *Shigella flexneri* (ATCC 12022), clinical *Shigella flexneri* and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). The test of antimicrobial activity was realized to determinate a minimum inhibitory concentration (MIC) and the adhesion test were performed, according to which the parameters regarding growth in the culture medium, number of colony-forming units (CFUs) released and evaluation of slides using scanning electron microscopy (SEM) were analyzed. It was found that 0.5%, 2.5% and 5.0% concentrations of xylitol do not have antimicrobial activity on the strains tested. However, the inhibition of adherence was demonstrated both by counting the released bacilli and by SEM microphotographs. For 0.5%, 2.5% and 5.0% concentrations of xylitol, CFUs were released, respectively of 89 ± 6 ; 187 ± 12 and 257 ± 30 *E.coli* ATCC 8739 bacilli; 198 ± 28 ; 282 ± 20 and 311 ± 30 clinical *E.coli* – EPEC bacilli ; 65 ± 4 ; 23 ± 2 and 31 ± 1 clinical *S. enterica* sorotipo Typhimurium bacilli ; 131 ± 3 ; 120 ± 6 and 58 ± 6 *S. flexneri* ATCC 12022 bacilli; 779 ± 15 ; 146 ± 2 and 56 ± 6 clinical *S. flexneri* bacilli; 2259 ± 130 ; 2990 ± 130 and 5330 ± 0 *P. aeruginosa* ATCC 9027 bacilli. For all the strains tested, the results obtained show that the inhibition of microbial adhesion, observed in slides treated with xylitol, is probably the mechanism of action of this compound. This study gives xylitol a greater added value, making it an appropriate biomolecule to be used as adjuvant therapeutic for the prevention and/or treatment of a series of recurrent infections.

Keywords: Bacterial Adhesion. Bacteria. Prevention and Control. Xylitol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do xilitol (C ₅ H ₁₂ O ₅).....	18
Figura 2	Fluxogramas da via química e da via biotecnológica para produção de xilitol.....	21
Figura 3	Esquema simplificado do metabolismo da xilose em leveduras.	23
Figura 4	Complexação do xilitol em solução aquosa pelos íons Ca ⁺²	29
Figura 5	Bacilos Gram-negativos de <i>Escherichia coli</i>	35
Figura 6	Estágio inicial da infecção por EPEC.....	36
Figura 7	Modelo esquemático das fases envolvidas na formação do biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	45
Figura 8	Fluxograma ilustrativo do teste de atividade antimicrobiana e do teste de aderência realizados para cada cepa-teste.....	48
Figura 9	Metalizadora utilizada para metalização das lamínulas no teste de aderência.....	52
Figura 10	Microscópio eletrônico de varredura utilizado para visualização das lamínulas no teste de aderência.....	52
Figura 11	Placas de avaliação do crescimento celular, após incubação das suspensões bacterianas em TSB, de cada tratamento experimental.....	54
Figura 12	Despreendimento de UFC's de <i>E. coli</i> ATCC 8739 pós-sonicação submetidas aos tratamentos experimentais.....	56
Figura 13	Despreendimento de UFC's de <i>E. coli</i> clínica (EPEC) pós-sonicação submetidas aos tratamentos experimentais.....	57

Figura 14	Despreendimento de UFC's de <i>S. enterica</i> sorotipo Typhimurium clínica pós-sonicação submetidas aos tratamentos experimentais.....	59
Figura 15	Despreendimento de UFC's de <i>S. flexneri</i> ATCC 12022 pós-sonicação submetidas aos tratamentos experimentais.....	60
Figura 16	Despreendimento de UFC's de <i>S. flexneri</i> clínica pós-sonicação submetidas aos tratamentos experimentais.....	62
Figura 17	Despreendimento de UFC's de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 pós-sonicação submetidas aos tratamentos experimentais.....	63
Figura 18	Microfotografias de MEV da cepa <i>E.coli</i> ATCC 8739 nos tratamentos experimentais.....	65
Figura 19	Microfotografias de MEV da cepa <i>E.coli</i> clínica (EPEC) nos tratamentos experimentais.....	66
Figura 20	Microfotografias de MEV da cepa <i>S. enterica</i> sorotipo Typhimurium clínica nos tratamentos experimentais.....	67
Figura 21	Microfotografias de MEV da cepa <i>S. flexneri</i> ATCC 12022 nos tratamentos experimentais.....	68
Figura 22	Microfotografias de MEV da cepa <i>S. flexneri</i> clínica nos tratamentos experimentais.....	69
Figura 23	Microfotografias de MEV da cepa <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 nos tratamentos experimentais.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades físico-químicas do xilitol.....	19
Tabela 2	Leveduras produtoras de xilitol.....	24
Tabela 3	Desprendimento bacteriano de <i>E. coli</i> ATCC 8739 nos tratamentos experimentais.....	55
Tabela 4	Desprendimento bacteriano de <i>E. coli</i> clínica (EPEC) nos tratamentos experimentais.....	57
Tabela 5	Desprendimento bacteriano de <i>S. enterica</i> sorotipo Typhimurium clínica clínica nos tratamentos experimentais.....	58
Tabela 6	Desprendimento bacteriano de <i>S. flexneri</i> ATCC 12022 nos tratamentos experimentais.....	60
Tabela 7	Desprendimento bacteriano de <i>S. flexneri</i> clínica nos tratamentos experimentais.....	61
Tabela 8	Desprendimento bacteriano de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 nos tratamentos experimentais.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	“Accumulation-associated protein” (Proteína associada ao acúmulo)
A/E	“Attaching and effacing” (Adesão e destruição)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	“American Type Culture Collection”
ATP	Adenosina trifosfato
BCC	<i>Burkholderia cepacia</i> complexo.
BFP	“Bundle forming pili” (Pili formador de feixes)
BGN	Bacilos Gram-Negativos
BGN-NF	Bacilos Gram-Negativos não fermentadores
CIM	Concentração inibitória mínima
CMH	Caldo Müeller Hinton
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EXPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
FDA	“Food and Drug Administration”
FFB	Faculdade de Farmácia e Bioquímica
GRAS	“Generally recognized as safe” (Geralmente reconhecido como seguro)
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
HAMS	Hemaglutinação manose-sensível
HAMR	Hemaglutinação manose-resistente
HU-UFJF	Hospital Universitário – Universidade Federal de Juiz de Fora
LA	“Localized adhesion” (Adesão localizada)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo – forma reduzida

NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato – forma reduzida
NIQUA	Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCA	“Plate count agar” (Ágar padrão para contagem)
PS/A	Galactose rica em polissacarídeos capsulares
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SAA	N-acetil-glucosamina
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. boydii</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>S. dysenteriae</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>S. sonnei</i>	<i>Shigella sonnei</i>
SPSS	“Statistical Package for the Social Sciences”
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
UFC	Unidade formadora de colônia
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
TIR	Taxa interna de retorno
TSA	“Tryptic soy agar” (Ágar triptona de soja)
TSB	“Tryptic soy broth” (Caldo triptona de soja)
XDH	Xilitol desidrogenase
XR	Xilose redutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 XILITOL: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E TOXICIDADE...	17
1.2 XILITOL: PRODUÇÃO.....	20
1.3 XILITOL: USO E APLICAÇÕES.....	25
1.4 XILITOL: PROPRIEDADE ANTIADERENTE.....	32
1.5 MICROBIOLOGIA DAS BACTÉRIAS EM ESTUDO	34
1.5.1 <i>Escherichia coli</i>	34
1.5.2 <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Typhimurium.....	37
1.5.3 <i>Shigella flexneri</i>	38
1.5.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
1.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	42
1.7 PROPRIEDADE ANTIADERENTE.....	43
1.8 COLONIZAÇÃO DE MATERIAIS MÉDICO-HOSPITALARES.....	44
2 OBJETIVOS	46
2.1. GERAL.....	46
2.2 ESPECÍFICOS.....	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 MICRORGANISMOS.....	47
3.2 XILITOL.....	47
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	48
3.3.1 Atividade antimicrobiana.....	48
3.3.2 Propriedade antiaderente.....	49
3.3.2.1 Avaliação do crescimento bacteriano.....	50
3.3.2.2 Avaliação do crescimento bacteriano pós-sonicação.....	50
3.3.2.3 Avaliação das lamínulas por MEV.....	51
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4 RESULTADOS	53
4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	53
4.2 PROPRIEDADE ANTIADERENTE.....	53
4.2.1 Crescimento bacteriano.....	53
4.2.2 Desprendimento bacteriano.....	54

4.2.2.1 <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	54
4.2.2.2 <i>Escherichia coli</i> clínica (EPEC).....	56
4.2.2.3 <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Typhimurium clínica.....	58
4.2.2.4 <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022.....	59
4.2.2.5 <i>Shigella flexneri</i> clínica.....	60
4.2.2.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.....	62
4.2.3 Aderência bacteriana – MEV.....	64
4.2.3.1 <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	64
4.2.3.2 <i>Escherichia coli</i> clínica (EPEC).....	65
4.2.3.3 <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Typhimurium clínica.....	67
4.2.3.4 <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022.....	68
4.2.3.5 <i>Shigella flexneri</i> clínica.....	69
4.2.3.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.....	70
5 DISCUSSÃO	71
5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	71
5.2 PROPRIEDADE ANTIADERENTE.....	73
6 CONCLUSÕES	80
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXO A	92
ANEXO B	100
ANEXO C	113
ANEXO D	123
ANEXO E	124
ANEXO F	125

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia é um ramo da ciência que vem contribuindo sistematicamente para o desenvolvimento de produtos, técnicas e biofármacos de grande aplicação na vida contemporânea. A pesquisa de novos fármacos de origem biotecnológica é um ramo promissor que tem se destacado nesses últimos anos. A biotecnologia vem contribuindo significativamente para a detecção precoce de várias doenças através do desenvolvimento de produtos e fármacos que possibilitam um tratamento de maior sucesso. Como vantagens destes produtos citam-se aproveitamentos de resíduos para síntese destes compostos, surgimento de novas moléculas e possibilidade de cura para diversas enfermidades.

A resistência microbiana aos fármacos presentes hoje no mercado é uma das principais dificuldades para um tratamento de sucesso. Esta resistência tende a se disseminar cada vez mais, uma vez que microrganismos possuem maneiras diversas de se tornarem resistentes rapidamente aos antimicrobianos em função de algum(s) destes mecanismos: modificação enzimática na estrutura do antimicrobiano; modificações pontuais como, por exemplo, na aquisição de uma nova proteína; impermeabilidade da membrana; aumento do efluxo do antimicrobiano ou modificação das vias enzimáticas (SILVEIRA et al., 2006)

Formalmente, o aparecimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos pode ser considerado como uma manifestação natural regida pelo princípio evolutivo da adaptação genética de organismos a mudanças no seu meio ambiente. Apesar da presença de poucos microrganismos geneticamente modificados não ser suficiente para produzir resistência, se uma população bacteriana infecciosa contendo alguns mutantes resistentes a determinado antimicrobiano for exposta a este fármaco, os genotipicamente alterados terão maior vantagem seletiva (SILVEIRA et al., 2006).

Dentro deste contexto, tem-se tornado essencial a intensificação de pesquisas de novas estratégias para se prevenir e/ou tratar as doenças infecciosas. Uma abordagem bastante promissora se baseia no conhecimento da aderência de microrganismos a diferentes superfícies, envolvendo tanto as superfícies celulares no hospedeiro quanto as superfícies de biomateriais, e de mecanismos que

impeçam essa colonização (OFEK, KAHANE e SHARON, 1996; OFEK, HASTY e SHARON, 2003).

O xilitol, composto de interesse deste estudo, atua diferentemente em relação aos antimicrobianos clássicos, ao agir impedindo a aderência do patógeno por um mecanismo pouco provável de induzir resistência. Desde que a aderência à superfície hospedeira é a primeira etapa na maioria das infecções, uma intervenção neste estágio é bastante benéfica na prevenção de uma determinada patologia. Além disso, a inibição da aderência de microrganismos a materiais médicos e hospitalares, como, por exemplo, diferentes tipos de cateteres, de sondas e de instrumentais cirúrgicos, compreende em uma medida preventiva quanto à disseminação de infecções hospitalares.

1.1 XILITOL: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E TOXICIDADE

O xilitol é um poli-álcool de cinco átomos de carbono que se apresenta na forma de um pó cristalino branco e possui poder edulcorante similar ao da sacarose (AGUIAR, OETTERER e MENEZESI, 1999). É um carboidrato natural de fórmula empírica $C_5H_{12}O_5$ (Figura 1), sem odor, altamente solúvel em água (64,2 g/100 mL), com ponto de fusão na faixa de 93,4 a 94,7°C e de massa molecular igual a 152,15 g/mol (TAMANINI e HAULY, 2004).

O xilitol foi descoberto em 1891 pelo químico alemão Emil Fischer (1852-1919) e pelo químico francês Gabriel Bertrand (1867-1962), que o prepararam, na forma de xarope, a partir da reação da xilose (açúcar obtido da madeira) com amálgama sódica (liga de mercúrio e sódio) (LIMA e BERLINCK, 2003). Este açúcar pode ser encontrado em líquens, fungos, algas, frutas e vegetais, e também como um intermediário do metabolismo de carboidratos em animais, inclusive no homem (LIMA e BERLINCK, 2003; TAMANINI e HAULY, 2004).

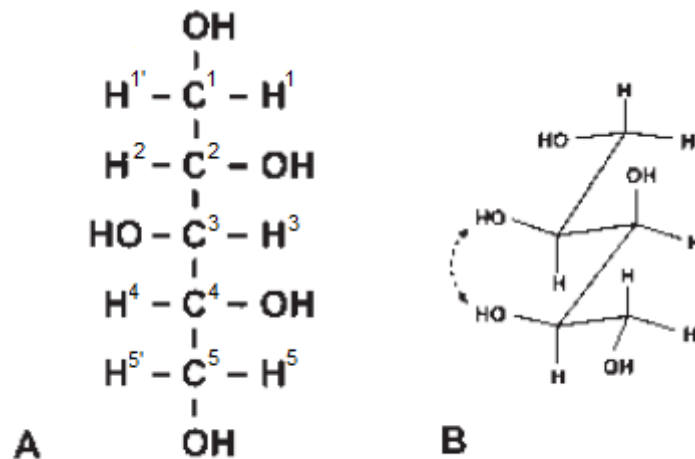


Figura 1 – Estrutura do xilitol (C₅H₁₂O₅). A) Numeração de cada átomo de carbono e hidrogênio individuais. B) Fórmula zig-zag da molécula. A dupla seta tracejada indica a interação entre o O₂ e O₄. Fonte MAKINEM, 2000

Em razão de seu elevado calor de solução endotérmico (34,8 cal/g), o xilitol produz um agradável efeito refrescante na boca, quando entra em contato com a saliva. Devido a essa propriedade organoléptica, o xilitol realça o efeito refrescante dos produtos com sabor de menta, tais como balas e gomas de mascar (MUSSATTO e ROBERTO, 2002). As propriedades físico-químicas do xilitol estão apresentadas na Tabela 1.

Pelo fato do xilitol não possuir grupos aldeídicos ou cetônicos em sua molécula, este composto não sofre reação de *Maillard*, o que significa que ele não sofre reações de escurecimento não enzimático ao reagir com proteínas sob aquecimento. Dessa forma, recomenda-se a utilização deste açúcar na manufatura de produtos nos quais as reações de *Maillard* são indesejáveis, tais como os alimentos infantis, por exemplo. Entretanto, seu uso em produtos nos quais o resultado dessa reação é importante para características visuais, como em produtos de padaria, o uso exclusivo de xilitol oferece problemas, uma vez que as reações de escurecimento são responsáveis pela aparência e pelas características flavorizantes desses produtos (MANZ, VANNINEN e VOIROL, 1973; BAR, 1991; MUSSATTO e ROBERTO, 2002).

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do xilitol.

PROPRIEDADES	CARACTERÍSTICAS OU VALORES
Fórmula empírica	C ₅ H ₁₂ O ₅
Massa molar	152,15 g/mol
Aparência	Pó cristalino
Cor	Branca
Sabor	Doce
Odor	Nenhum
Ponto de Fusão	92-96°C
Ponto de Ebulição	216°C (1 atm)
pH (solução aquosa a 10%)	5-7
Densidade (solução aquosa a 10%)	1,03 g/mL
Solubilidade em água a 20 °C	63 g/100 g solução
Calor de Solução (endotérmico)	34,8 cal/g
Valor Calórico	2,4 kcal/g
Índice de Refração à 25 °C (solução aquosa a 10%)	1,3471
Higroscopicidade	Em elevada umidade relativa, é mais higroscópico que a sacarose e menos que o sorbitol
Poder adoçante	Similar ao da sacarose, superior ao do sorbitol e manitol
Estabilidade	Estável a 120°C (não carameliza)

Fonte: Adaptada de BAR, 1991, p. 350.

A incorporação de xilitol em alimentos é permitida por este ser considerado uma substância atóxica e, portanto, conhecido como um aditivo geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pelo *Food and Drug Administration* (FDA), ou seja, classe de substâncias químicas altamente seguras para serem adicionadas a alimentos (MUSSATTO e ROBERTO, 2002). A resolução RDC nº 24, de 15 de fevereiro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova a utilização de xilitol como aditivo alimentar e coadjuvante de tecnologia (BRASIL, 2005). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), testes de toxicidade aguda executados em animais, nos quais o xilitol foi administrado por via oral, indicaram que este açúcar apresentou toxicidade muito baixa (FERREIRA, 2007). Voirol (1977) observou em seus estudos que indivíduos que utilizaram o xilitol como único adoçante, por um período de dois anos, não apresentaram significativos efeitos colaterais.

O uso de xilitol está liberado em mais de 50 países do mundo, incluindo membros da União Européia, Suíça, Brasil, Argentina, Austrália, Japão, Coreia do

Sul e China (AGUIAR, OETTERER e MENEZES, 1999). A aprovação estende o uso do xilitol para todas as categorias de alimentos, produtos dietéticos, farmacêuticos, de higiene oral e cosméticos (KRUGER, 2005). Além disso, o xilitol é mais inerte quimicamente do que a sacarose, o que possibilita um maior tempo de prateleira aos produtos que contenham xilitol (BAR, 1991).

1.2 XILITOL: PRODUÇÃO

A obtenção do xilitol pode ser realizada de três maneiras: extração líquido-sólido, redução química da xilose, e conversão biotecnológica de soluções contendo xilose. A primeira via de produção, que compreende a separação de um componente sólido solubilizado por um solvente líquido, utiliza vegetais e frutas (banana, alface, morango, cenoura, espinafre e berinjela, entre outros) como matéria prima, bem como líquens, fungos, algas e cogumelos. Contudo, como o xilitol está presente em pequena proporção (menos de 900 mg em cada 100 g de matéria-prima), este processo torna-se inviável economicamente (PARAJÓ, DOMÍNGUES e DOMÍNGUES, 1998a; LIMA e BERLINCK, 2003; TAMANINI e HAULY, 2004).

O processo químico ocorre por meio de redução catalítica da xilose purificada em presença do catalisador Níquel de Raney. Este processo inclui quatro etapas básicas: 1) obtenção da xilose por hidrólise ácida de material vegetal rico em xilana; 2) purificação da xilose obtida; 3) hidrogenação catalítica da xilose formando xilitol e 4) cristalização do composto. O rendimento do processo químico e a qualidade do xilitol dependem da pureza da solução inicial de xilose, já que a presença de impurezas interfere na reação catalítica (LIMA e BERLINCK, 2003; TAMANINI e HAULY, 2004). São necessárias operações de purificação (como troca iônica, descoloração e fracionamento cromatográfico) para remoção do catalisador e obtenção de uma solução de xilose de elevada pureza. Após a remoção do catalisador por filtração e troca iônica, a solução de xilitol é concentrada, fracionada por cromatografia e cristalizada para obtenção do produto puro (LIMA e BERLINCK, 2003; TAMANINI e HAULY, 2004). No entanto, o processo possui custo extremamente elevado uma vez que ocorre em reatores de elevada pressão e temperatura, além de requerer etapas de purificação da xilose antes de sua

hidrogenação a xilitol. O custo de produção do xilitol por processo químico é cerca de 10 vezes maior que o da sacarose ou do sorbitol (MUSSATTO e ROBERTO, 2002)

Diante das dificuldades relacionadas com o processo químico de obtenção do xilitol, que resulta em elevado preço do produto final, surgiu a necessidade de se desenvolver tecnologias alternativas e mais atraentes de obtenção do xilitol (PARAJÓ, DOMÍNGUES e DOMÍNGUES, 1998a). A alternativa encontrada ao processo convencional envolve a produção biotecnológica, em que o xilitol pode ser obtido por via enzimática, com obtenção de maiores valores de conversão, e/ou por via microbiológica (podendo ser utilizadas bactérias, leveduras e fungos) a partir da fermentação de soluções ricas em xilose, sem a necessidade de purificação prévia do substrato (Figura 2). Vários outros produtos comerciais são obtidos por fermentação, destacando-se o etanol, utilizado como combustível (NIGAM e SINGH, 1995; LIMA e BERLINCK, 2003).

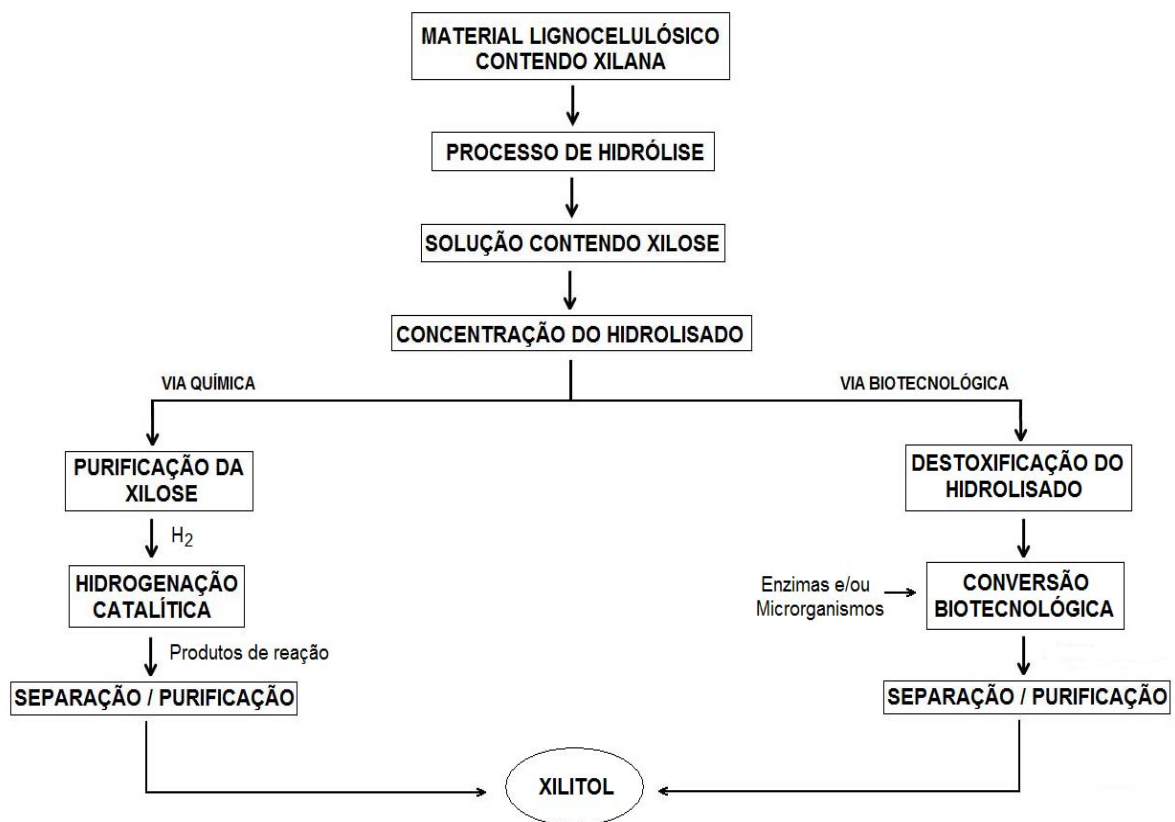


Figura 2 – Fluxogramas da via química e da via biotecnológica para produção de xilitol.
Fonte: MUSSATTO e ROBERTO, 2002

Como relevantes vantagens da via biotecnológica de produção pode-se citar a não formação de compostos tóxicos, reduzindo significativamente os custos relacionados com a separação e purificação do produto final; e a ocorrência do processo em baixas temperaturas e pressão, o que também diminui os custos e possibilita a aplicação em vários segmentos industriais e institucionais. Além disso, nessa produção não há necessidade da purificação inicial da xilose, uma vez que a sua conversão a xilitol ocorre diretamente no próprio hidrolisado hemicelulósico proveniente dos resíduos lignocelulósicos (NIGAM e SINGH, 1995; LIMA e BERLINCK, 2003). Entre as vantagens apresentadas pelos processos biotecnológicos destaca-se ainda o fato da produção apresentar características que minimizam o impacto ambiental, como diminuição da toxicidade dos efluentes e o uso de recursos renováveis (biomassa vegetal). No caso da via biotecnológica proposta para a produção de xilitol, utilizam-se resíduos agroindustriais como bagaço de cana, palha de arroz, palha de trigo e sobras de eucaliptos, potencializando o caráter de redução de custos financeiros e ambientais (LIMA e BERLINCK, 2003).

O processo biotecnológico de produção do xilitol se apoia no fato deste ser um intermediário do metabolismo de D-xilose em leveduras (TAMANINI e HAULY, 2004). A obtenção de xilitol por via biotecnológica está, contudo, associada à capacidade dos microrganismos de sintetizar a enzima xilose redutase (XR). Inicialmente, essa enzima catalisa a redução de xilose a xilitol com a participação dos cofatores NADPH ou NADH. O xilitol, composto relativamente estável, ou é excretado da célula, ou é oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), cuja atividade requer os cofatores NAD ou NADP (Figura 3). Em resumo, a produção de xilitol depende de uma elevada atividade da enzima XR ou de uma baixa atividade da enzima XDH, sendo o grau de atividade dessas enzimas o critério utilizado para identificar os melhores produtores (MUSSATTO e ROBERTO, 2002). Embora as leveduras sejam mais aptas que as bactérias para produzir xilitol, é difícil classificar suas várias espécies quanto à capacidade produtiva. Acredita-se que as que têm maior potencial pertencem ao gênero *Candida* (Tabela 2) (MAYERHOFF *et al.*, 1996; MUSSATTO e ROBERTO, 2002).

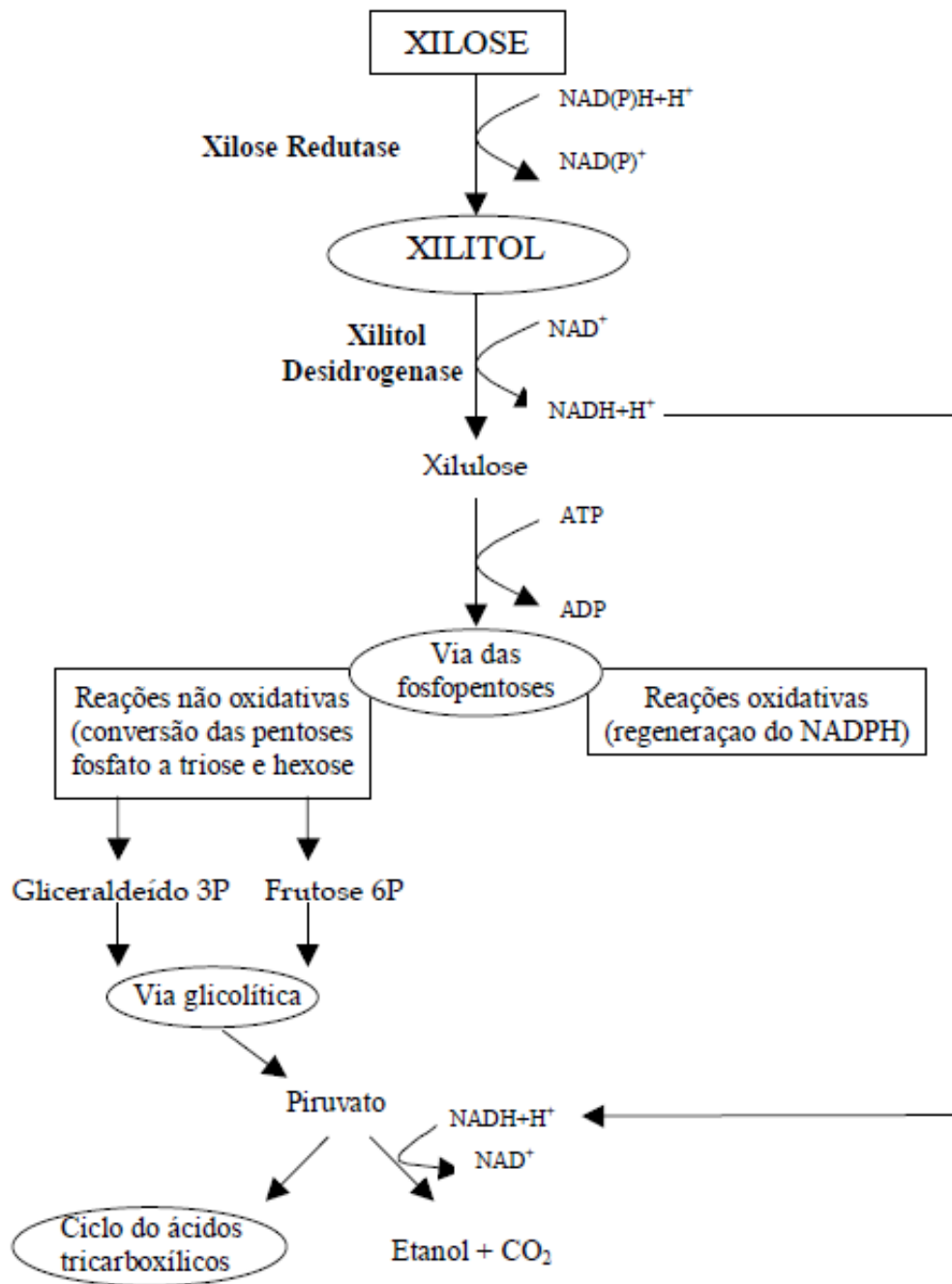


Figura 3 – Esquema simplificado do metabolismo da xilose em leveduras. Fonte: TAMANINI e HAULY, 2004

Tabela 2 – Leveduras produtoras de xilitol. Os códigos indicam diferentes linhagens e a produção é por litro de meio de cultura.

LEVEDURAS	XILITOL (g/l)
<i>Candida boidinii</i> (NRRL Y-17213)	2,9
<i>Candida guilliermondii</i> (FTI-20037)	37
<i>Candida intermedia</i> (RJ-248)	5,7
<i>Candida mogii</i> (ATCC 18364)	31
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 34078)	20
<i>Candida pseudotropicalis</i> (IZ-431)	4,3
<i>Candida tropicalis</i>	2,1
<i>Candida tropicalis</i> (HXP ₂)	4,8
<i>Candida tropicalis</i> (1004)	17
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 7349)	20
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 20240)	5,5
<i>Candida utilis</i> (ATCC 22023)	1,8
<i>Candida utilis</i> (C-40)	3
<i>Debaryomyces hansenii</i> (C-98, M-21)	0,8
<i>Hansenula anomala</i> (IZ-1420)	6,1
<i>Kluyveromyces fragilis</i> (FTI-20066)	4,6
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (IZ-1821)	6,1
<i>Pichia (Hansenula) anomala</i> (NRRL Y-366)	2
<i>Pachysolen tannophilus</i> (NRRL Y-2460)	2,2
<i>Saccharomyces</i> (SC-13)	0,7
<i>Saccharomyces</i> (SC-37)	2,3
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (16979)	0,2

FONTE: Adaptado de LIMA e BERLINCK, 2003.

Apesar das diversas pesquisas desenvolvidas na produção biotecnológica via fermentação, ainda não foi possível obter concentrações de xilitol suficientes para a etapa de cristalização. Para aumentar a produtividade desse processo, estão sendo aplicadas estratégias de engenharia metabólica, que consistem no desvio do metabolismo, para aumentar a formação desse poliálcool e diminuir o seu consumo pelo próprio. Embora tenha se observado os crescentes rendimentos, produtividades e

concentrações de xilitol obtidos pela via biotecnológica, estes valores ainda não são suficientes para esta substituir o processo químico atualmente utilizado. São necessárias investigações para melhor compreensão do metabolismo da xilose em xilitol, dos efeitos da disponibilidade de oxigênio na conversão e da ação sinérgica dos inibidores de crescimento microbiano presentes nos hidrolisados hemicelulósicos (LIMA e BERLINCK, 2003).

Sarrouh (2009) realizou um estudo operacional e de viabilidade econômica da produção biotecnológica de xilitol em reator de leito fluidizado utilizando bagaço de cana de açúcar e células imobilizadas. O aumento no fluxo de fluidização obtido resultou em um maior consumo de xilose e consequente acúmulo de xilitol, uma vez que promoveu melhor transferência de oxigênio do meio para o interior do suporte de imobilização. Além disso, este processo permitiu a reutilização sucessiva das células imobilizadas durante bateladas repetidas sem reduções no fator de rendimento de xilose em xilitol e na concentração final de xilitol. Esta nova forma de produção proposta mostrou-se economicamente viável com um tempo de retorno de capital investido de 24 meses, uma taxa interna de retorno (TIR) de 51,7% e um preço de venda do xarope de xilitol (80% de pureza) de R\$ 211,60, representando 53% do preço do xilitol cristalizado no mercado interno (R\$ 402,50). Visando ainda reduzir o custo de venda deste xarope e aumentar a competitividade do xilitol em relação aos demais polióis encontrados no mercado, foram sugeridas modificações em algumas etapas do processo em estudo. Dentre elas, o aumento na eficiência da hidrólise para 80% e a utilização de resinas de troca iônica no tratamento do hidrolisado hemicelulósico. Dessa forma, o processo modificado resultou na redução de 62% no preço de venda do xarope (R\$ 113,10), apenas 28% do preço de venda do xilitol cristalizado, com o mesmo tempo de retorno de capital investido. Este processo biotecnológico de produção do xilitol mostrou-se economicamente promissor para uma futura implantação em nível industrial.

1.3 XILITOL: USO E APLICAÇÕES

O xilitol constitui um insumo de grande importância para a indústria alimentícia, odontológica e farmacêutica (SILVA et al., 1994), podendo ser

empregado como adoçante em gomas de mascar, chocolate, produtos de panificação, confeitos, condimentos, entre outros alimentos. Pode ser utilizado também em preparações farmacêuticas, devido o seu poder refrescante. Além disso, o xilitol funciona como insumo nas indústrias de papel e fumo e como poliol na manufatura de resinas (SILVA et al., 1994; AGUIAR, OETTERER e MENEZES, 1999).

Recentes pesquisas com animais e humanos demonstram que o xilitol, além de poder ser utilizado como um ingrediente alimentar, possui várias aplicações clínicas, sendo indicado para tratar diabetes, lesões renais e parenterais, bem como para prevenir otite, cáries dentárias, infecções pulmonares e osteoporose. Os resultados até agora obtidos já permitem uma análise global dos benefícios da administração de xilitol para pacientes com diversos tipos de patologias (MUSSATTO e ROBERTO, 2002).

Uma alimentação correta, variada e completa cobre nossas necessidades biológicas básicas, permitindo que nosso organismo funcione com normalidade, além de ser importante para a redução do risco de certas alterações ou doenças a curto e longo prazo. A ligação entre os excessos alimentares e a elevada prevalência de doenças crônicas tem sido objeto de crescente interesse entre pesquisadores e entidades governamentais. Desde o início dos anos 60, comitês especializados em diversos países têm apresentado recomendações nutricionais como forma de prevenir os problemas de saúde decorrentes desses maus hábitos alimentares, cada vez mais comuns em países desenvolvidos (FREIRE, CANNON e SHEIHAM, 1994). O aumento do consumo de açúcares nas últimas cinco décadas, em especial, na forma de sacarose, vem provocando vários problemas de saúde (LIMA e BERLINCK, 2003). A cárie e a obesidade são as duas condições mais frequentemente relacionadas ao consumo de açúcares extrínsecos, juntamente com outras doenças crônicas (ou fatores de risco para as mesmas) tais como diabetes, doenças coronarianas e trigliceridemia (FREIRE, CANNON e SHEIHAM, 1994). Neste sentido, vários estudos têm sido conduzidos na tentativa de se encontrar substitutos que evitem efeitos indesejáveis e que ajudem a reverter o quadro atual (FREIRE, CANNON e SHEIHAM, 1994; SILVA et al., 1994; AGUIAR, OETTERER e MENEZES, 1999). Muitos adoçantes alternativos já são empregados em vários tipos de alimentos, sendo que um deles, o xilitol, tem-se mostrado como uma boa opção para substituir a sacarose (LIMA e BERLINCK, 2003).

O xilitol no corpo humano é produzido, regularmente, durante o metabolismo do organismo, pela via glucurônica (também denominada de via do ácido urônico), em quantidades que variam de 5 a 15 g/dia (VANDESKA et al., 1996; PARAJÓ, DOMÍNGUEZ E DOMÍNGUEZ, 1998b; AGUIAR, OETTERER e MENEZES, 1999; TAMANINI e HAULY, 2004; ARAUJO, 2007). A produção do xilitol depende de uma série de reações químicas que ocorrem durante o metabolismo dos carboidratos, com a formação de moléculas simples de glicose e pela ação da enzima hexoquinase e do nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP). A hexoquinase e o ATP fazem a conversão da glicose para a glicose-6-fosfato. A partir daí, a glicose-6 fosfato segue por uma via principal, denominada de glicólise, seguida da via respiratória e fosforilação oxidativa. Por outro lado, a glicose-6-fosfato também segue por uma via alternativa, denominada de via do ácido urônico, na qual há a produção, dentre outros compostos, de xilitol (ARAUJO, 2007).

O metabolismo do xilitol pouco contribui para a formação de tecido adiposo e é independente da insulina, o que possibilita sua utilização como adoçante na dieta para diabéticos. O xilitol possui baixa absorção intestinal quando comparado à sacarose, e, por isso, pode ser recomendado para diabéticos, já que não produz mudanças rápidas na glicemia (AGUIAR, OETTERER e MENEZES, 1999; TAMANINI e HAULY, 2004).

Segundo Bar (1991), o xilitol pode seguir duas vias metabólicas, a princípio: a primeira engloba o metabolismo direto ou absorção pelo organismo, principalmente pelo fígado, enquanto a segunda compreende a fermentação do xilitol, não absorvido, pela flora intestinal. De fato, nenhuma das duas principais vias de absorção do xilitol (fígado e flora intestinal) é mediada pela insulina (MUSSATTO e ROBERTO, 2002). Embora o xilitol possa penetrar em quase todas as células do organismo, as do fígado são especialmente permeáveis e contêm uma enorme quantidade de enzimas capazes de rapidamente metabolizá-lo e transformá-lo em energia. A absorção pelo intestino é, ao contrário, consideravelmente lenta (MUSSATTO e ROBERTO, 2002).

Toda a D-glicose proveniente do metabolismo do xilitol é primeiro estocada como glicogênio no fígado e depois liberada gradualmente. Desse modo, sua concentração no sangue não sofre as mudanças bruscas causadas pela sacarose e pela glicose, o que faz do xilitol um adoçante apropriado para pacientes com *diabetes mellitus* tipo I ou tipo II (MUSSATTO e ROBERTO, 2002).

O xilitol não é fermentado pela maioria dos microrganismos da cavidade bucal humana, exercendo efeito cariostático e inibindo a desmineralização dos dentes (SILVA et al., 1994; AGUIAR, OETTERER e MENEZES, 1999; TAMANINI e HAULY, 2004). Essa ação foi observada sobre a bactéria *Streptococcus mutans*, principal causador das cáries. O efeito não cariogênico é uma consequência deste microrganismo e de outros que formam a placa bacteriana, não fermentarem tal açúcar, não o utilizando como uma fonte de carbono. Além disso, o xilitol estimula a salivagem e, por não ser fermentado, faz com que não haja diminuição do pH e acidificação do meio, o que contribuiria para o crescimento do *Streptococcus mutans* e para o desenvolvimento da cárie (IWATA et al., 2003).

A estrutura química do xilitol é caracterizada por uma sequência treco de grupos hidroxila (-OH). Esta configuração pode ser responsável pela formação de complexos estáveis com íons, como por exemplo, com cálcio (Figura 4) (MAKINEM, 2000). Acredita-se que o xilitol possua a capacidade de transportar e de formar complexos com íons cálcio, e, com isso, é capaz de penetrar no esmalte dentário. Sugere-se que o xilitol, além de atuar na prevenção de cáries, possa atuar também tanto na prevenção da desmineralização quanto na remineralização dos dentes revertendo o quadro de erosão dental (AMAECHI, HIGHAM e EDGAR, 1998; SANO et al., 2007). A remineralização é promovida geralmente por minerais, em particular íons cálcio e fosfato, que estão presentes naturalmente na saliva. Uma vez que a substituição do açúcar por xilitol estimula a salivagem (pelo seu agradável sabor refrescante), um aumento da quantidade de saliva aumenta também a quantidade dos minerais nela presentes (MUSSATTO e ROBERTO, 2002).

O uso alternativo como adoçante, em substituição à sacarose, por pacientes diabéticos e obesos, e o efeito anticariogênico, são as duas aplicações mais difundidas do xilitol. Sendo assim, a importância econômica e social deste açúcar reside principalmente no seu alto poder adoçante e em sua propriedade anticariogênica, o que o coloca como um produto de elevado valor agregado.

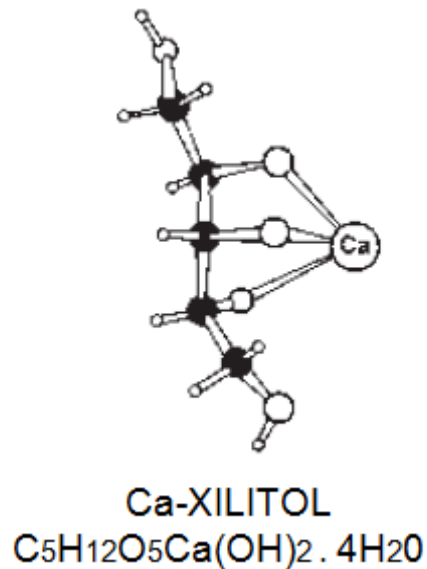


Figura 4 – Complexação do xilitol em solução aquosa pelos íons Ca⁺². Fonte MAKINEM, 2000

O uso do xilitol em nutrição parenteral é recomendado pelo fato de não haver reação entre xilitol e aminoácidos, o que facilita a produção de infusões contendo ambos, e também pelo fato dos tecidos poderem utilizar xilitol sob condições pós-operatórias ou pós-traumáticas (YLIKAHRI, 1979). Pacientes sob tais condições apresentam uma excreção excessiva dos hormônios do stress (cortisol, hormônios do crescimento entre outros), os quais provocam resistência à absorção da insulina e impedem a utilização eficiente da glicose pelo organismo. Dessa forma, o tratamento com xilitol é indicado uma vez que produz apenas um aumento limitado dos níveis de glicose (YLIKAHRI, 1979). Georgieff et al. (1991) observaram que ao usar xilitol, em nutrição parenteral de ratos com queimaduras, não houve degradação das proteínas como acontecia quando tal solução era preparada com glicose. Sendo assim, uma nova formulação, composta por solução aquosa, aminoácidos e xilitol, para nutrição parenteral, foi patenteada para o tratamento de pacientes com estresse severo ou complicações renais. Tal preparação reduz a perda de nitrogênio e acelera a gliconeogênese (GEORGIEFF e OEHMKE, 1990).

Manifestações clínicas como anemia hemolítica induzida por drogas ou por infecção, icterícia neonatal e anemia hemolítica congênita crônica estão associadas à deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). A enzima G6PDH é responsável pela manutenção de um nível adequado da coenzima reduzida

NADPH e é necessária para o metabolismo da glicose. A deficiência desta enzima promove a diminuição dos eritrócitos. O xilitol é um agente terapêutico que pode ser utilizado por pessoas com deficiência de G6PDH, uma vez que essa enzima não é requerida para o seu metabolismo. Assim sendo, o xilitol supre a célula de NADPH₂ por meio da oxidação da L-xilulose, mantendo a integridade da membrana dos glóbulos vermelhos (YLIKAHRI, 1979; MUSSATTO e ROBERTO, 2002).

O xilitol atua também sobre microrganismos do sistema respiratório. Problemas como otite média, sinusite, congestões nasofaríngeas e inflamações associadas a complicações respiratórias podem ser prevenidas e tratadas com aplicação nasal de xilitol em solução salina. Além disso, administração de xilitol por preparações sólidas (gomas de mascar, pó e comprimido, por exemplo) pode ser usada em tratamento de infecções respiratórias em geral, principalmente em otite média aguda em humanos (UHARI et al., 1996). Em um experimento duplo-cego e randômico realizado com cerca de 300 crianças por Uhari et al. (1996), foi sugerido que a ação do xilitol em controlar a otite média aguda se refere à própria presença do açúcar e não a uma função mecânica, como, por exemplo, a mastigação da goma de mascar utilizada nos ensaios, contendo xilitol e sacarose.

A eficiência do xilitol no tratamento de doenças respiratórias (ZABNER et al., 2000; TAPIAINEN et al., 2001; MUSSATTO e ROBERTO, 2002) é atribuída a sua baixa permeabilidade transepitelial. Dessa forma, o xilitol não é metabolizado pela maioria das bactérias e, com isso, diminui a concentração de sais no líquido que reveste a superfície interna dos pulmões (ZABNER et al., 2000). Esta superfície é revestida por uma fina camada de líquido que contém substâncias antimicrobianas capazes de eliminar as bactérias constantemente aspiradas ou inaladas, prevenindo dessa forma as infecções pulmonares. O aumento da concentração de sais nesse envoltório líquido das células, que reveste o interior dos pulmões, inibe a atividade antimicrobiana dessas substâncias, fazendo com que as bactérias se espalhem e produzam infecções crônicas. Reduzindo-se a concentração salina do líquido, pode-se aumentar a atividade antimicrobiana e prevenir a infecção (MUSSATTO e ROBERTO, 2002). Experimentos realizados por Zabner et al. (2000), a partir de 50 µl de uma solução 3 mM de xilitol, demonstraram que as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (principais causadoras de doenças pulmonares) não utilizam xilitol para crescimento, o que faz diminuir a concentração de sais no líquido e aumentar a atividade antibiótica natural dos pulmões. Pode-se dizer,

portanto, que o xilitol fortalece o sistema de defesa natural dos pulmões, atrasando ou prevenindo o estabelecimento de infecções bacterianas, entre as quais se inclui a pneumonia.

Outra aplicação do xilitol seria no tratamento ou na prevenção da osteoporose. Ele atua promovendo o aumento da massa dos ossos, preservando os minerais neles existentes e evitando o enfraquecimento de suas propriedades biomecânicas. O combate da osteoporose pelo xilitol se dá através do estímulo da absorção de cálcio pelo intestino e da facilidade de sua passagem do sangue para os ossos. O conteúdo de cálcio nos ossos é, assim, aumentado, diminuindo a necessidade de reabsorção (MATTILA, KNUUTTILA e SVANBERG, 1998; MATTILA et al., 1998; MATTILA et al., 1999). No estudo realizado por estes mesmos autores, a dieta dos animais foi suplementada com uma quantidade de xilitol que variou de 10 a 20% na formulação da ração, tendo ficado evidente que quanto maior é a dose de xilitol na alimentação, melhores são os resultados alcançados no combate à osteoporose.

Takahashi, Onodera e Akiba (1999) realizaram pesquisas com aves de até 12 dias de idade, alimentando-as por 10 dias com uma dieta que continha 15% de xilitol. Após esse período, injetaram antígenos nas aves para induzir processos inflamatórios e observaram que o tratamento com xilitol, além de aliviar o retardamento do crescimento e a anorexia provocados pela infecção, ainda preveniu a perda de peso dessas aves, sem afetar ou alterar qualquer outra parte do seu sistema. Embora pouco numerosas, as pesquisas referentes à aplicação do xilitol na cura ou controle de processos inflamatórios são muito promissoras, pois indicam que, com um baixo conteúdo de xilitol na dieta é possível se obter resultados positivos num curto período de tratamento, sem prejudicar o funcionamento geral do organismo. O uso do xilitol como suplemento alimentar (6 a 15% da alimentação) tem demonstrado bons resultados em relação a processos inflamatórios agudos induzidos (MUSSATTO e ROBERTO, 2002).

Em preparações oftálmicas, polióis como xilitol, sorbitol, manitol e inositol, ou mesmo combinações destes, podem ser utilizados para diminuir a pressão intraocular (por aplicação tópica ou solução) (BASOTHERM GMBH, 1994). Franz, Kompa e Rozman (1996) patentearam uma solução para uso tópico contendo xilitol com propriedade de diminuir a pressão intraocular.

1.4 XILITOL: PROPRIEDADE ANTIADERENTE

Na literatura científica há alguns relatos da atuação do xilitol sobre diversas bactérias, impedindo sua aderência ao tecido a ser infectado (NAABER et al., 1996; SAJJAN et al., 2004; FERREIRA, 2007; AMMONS et al., 2009; SÖDERLING e HIETALA-LENKKERI, 2010). Makinen (2000) reforça, em seu trabalho, a atividade anticariogênica deste composto, ao estudar recém-nascidos cujos familiares mascavam gomas contendo xilitol. Foi constatado que tal hábito evitava que os recém-nascidos apresentassem cáries, uma vez que aerossóis provenientes da mãe seriam a via de transmissão mais comum do microrganismo *Streptococcus mutans*. Essa ação ocorre porque o xilitol impede a aderência da bactéria nos dentes, diminuindo a contagem de células e também a chance de transmissão. O mecanismo de ação do xilitol neste caso pode ser explicado pela habilidade das moléculas pentitóis de alterarem a aderência associada às estruturas da superfície dos patógenos.

Em um estudo realizado com células da mucosa intestinal denominadas de Caco-2 foi observado que o xilitol impediu a aderência e, conseqüentemente, o desenvolvimento de *Clostridium difficile*, uma bactéria altamente virulenta e considerada responsável pelo processo inflamatório que ocorre na colite pseudomembranosa. Essa inibição foi dose-dependente, mas o mecanismo de ação permanece desconhecido (NAABER et al., 1996).

Masako et al. (2005a e 2005b) estudaram pacientes que apresentavam dermatite atópica, doença inflamatória da pele na qual a bactéria *Staphylococcus aureus* está presente em 95% dos casos. Verificaram que o xilitol inibiu a formação do glicocálix deste microrganismo e atuou sinergicamente com o farnesol (sesquiterpeno abundante em óleos essenciais com potencial antimicrobiano) no controle da patologia. A ação coadjuvante do xilitol é importante, uma vez que o glicocálix é a principal estrutura bacteriana responsável pela resistência a fármacos.

Ferreira (2007) observou, por meio de ensaios *in vitro*, a propriedade antiaderente do xilitol. Constatou que este poliol não possui atividade antimicrobiana, mas sim a propriedade de antiaderência sobre o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), sendo este o provável mecanismo de ação do xilitol frente a esta bactéria. Além disso, constatou, através de testes *in vivo*, que o xilitol poderia ser uma

biomolécula adequada para ser utilizada no tratamento da dermatite atópica, visto que não é irritativo para a pele. Entretanto, este açúcar apresentou fototoxicidade e, por isso, deve ser administrado com o uso concomitante de um protetor solar.

Sajjan et al. (2004) observaram que o xilitol (60-80 mg/mL) inibiu em 65% o crescimento da bactéria do complexo *Burkholderia cepacia* (BCC), cuja ausência está intimamente relacionada ao sucesso do transplante de pulmões. Kontiokari, Uhari e Koskela (1998) avaliaram a aderência de microrganismos relacionados com colonização nasal e também com a otite média expondo três grupos a 5% de xilitol: células epiteliais, bactérias e células epiteliais + bactérias. Foi constatado que o xilitol impediu a aderência da bactéria *Streptococcus pneumoniae*, e em menor proporção, a de *Haemophilus influenzae*; no entanto, não impediu significativamente a aderência de *Moraxella catarrhalis*. Contraditoriamente, Kontiokari et al. (1999), observaram que o 5% de xilitol não foi capaz de impedir a infecção nasofaríngea por *Streptococcus pneumoniae* quando administrado em ratos por via oral ou nasal. Tapiainen et al. (2004) observaram que exposição de *Streptococcus pneumoniae* em meio contendo xilitol 0,5% e 5,0%, após 2 h de contato, provocou diminuição do diâmetro da cápsula e dissolução do conteúdo da mesma. E, ainda, que esta modificação é capaz de afetar a aderência e virulência dessa bactéria, o que pode explicar a eficácia clínica do xilitol na prevenção da otite média aguda.

Lee et al. (2006) observaram que o xilitol (0,01 mg/mL) impede a aderência da bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em eritrócitos humanos (ensaio de hemaglutinação), a qual é normalmente associada à colonização de bolsas periodontais.

Söderling e Lenkkeri-Hietala (2010) constataram que 4% de xilitol foi capaz de inibir, *in vitro* (superfície de vidro lisa), a aderência de seis cepas de *Streptococcus* sp. orais. Estes autores observaram também que o mecanismo de impedimento da aderência não era dependente da inibição do crescimento microbiano. Ammons et al. (2009) observaram que 5% de xilitol poderia diminuir significativamente a viabilidade do biofilme formado, *in vitro*, por uma cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa*.

Um spray contendo sal de zinco e xilitol, com atividade antialérgica, anti-histamínica e bactericida foi patenteado e o mecanismo de ação envolvido se baseia na inibição da aderência bacteriana (PK HOLDINE B V, 2005).

Tem-se observado uma crescente e potencial aplicação do xilitol na área

farmacêutica, além de suas já tradicionais aplicações como, por exemplo, aditivo alimentar, produto anticariogênico e açúcar alternativo para diabéticos (LIMA e BERLINCK, 2003). Estudos recentes apontam seu provável efeito terapêutico no controle de diversas patologias (SAJJAN et al., 2004; TAPIAINEM et al., 2004). Vale ressaltar que para as bactérias patogênicas do trato gastrointestinal a aderência ao epitélio é um processo essencial para a sobrevivência e colonização das mesmas. Após este primeiro passo, ocorre a liberação de enzimas e toxinas que levam ao início de um processo direto de necrose da célula-alvo podendo resultar na invasão celular pelo microrganismo (JANKOWSKA et al., 2008).

Diante disso, torna-se necessário elucidar a possível atuação do xilitol frente às bactérias responsáveis por diferentes doenças infecciosas, uma vez que a etapa da aderência microbiana nestas infecções é o momento de maior importância para a instalação da patologia. Além disso, torna-se igualmente relevante estudar a propriedade antiaderente do xilitol sobre as principais bactérias isoladas de produtos hospitalares como, por exemplo, diferentes tipos de catéteres vasculares, sondas, próteses e instrumentos cirúrgicos. Dentro deste contexto, o xilitol poderia ser incorporado nestes materiais, visando impedir a formação de biofilmes e de consequentes infecções instaladas nos pacientes internados.

1.5 MICROBIOLOGIA DAS BACTÉRIAS EM ESTUDO

1.5.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo (BGN) da família *Enterobacteriaceae* (Figura 5). É a bactéria comensal aeróbia encontrada em maior quantidade no intestino grosso. Atualmente são conhecidas variantes de *Escherichia coli* que apresentam virulência: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga que inclui a *E. coli* enterohemorrágica (STEC/EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* patogênica extraintestinal (EXPEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998; SILVA e SILVA, 2005; LORENZONI, 2009). A

EPEC é uma variante de grande importância por causar diarreia infantil, principalmente em comunidades de baixa renda, onde estão associadas condições precárias de habitação, subnutrição, falta de água potável e de rede de esgotos (SILVA e SILVA, 2005).

As técnicas mais utilizadas para a detecção e identificação de *Escherichia coli* baseiam-se em características morfológicas e em reações bioquímicas. Atualmente, métodos não sorológicos que evidenciam a presença de fatores de virulência tais como a capacidade de aderir e invadir as células do epitélio intestinal, e também a de produzir toxinas, têm sido empregados com sucesso como alternativos aos métodos tradicionais de caracterização e identificação de *E. coli*. Um dos testes mais úteis para a diferenciação entre sorogrupos enteropatogênicos deste microrganismo é o de aderência a células HeLa ou HEp-2, o qual tem sido muito utilizado (NATARO e KAPER, 1998; LIBERATORE et al., 2007; LORENZONI, 2009).

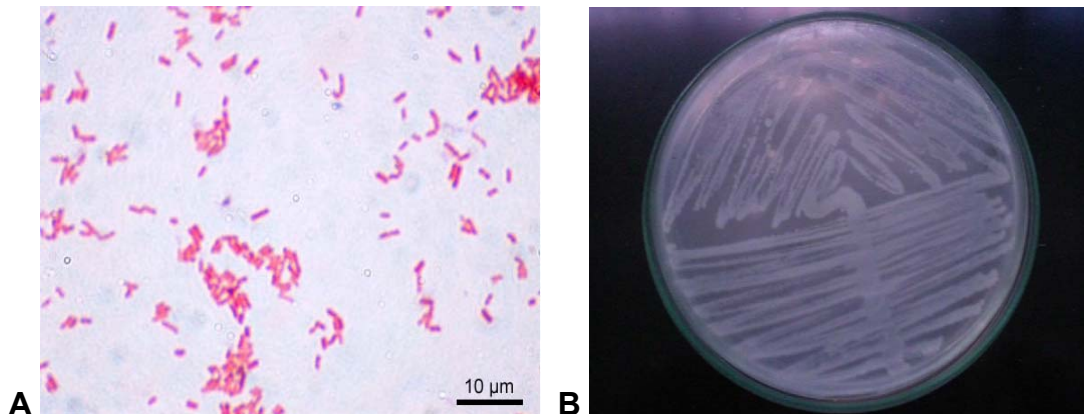


Figura 5 – Bacilos Gram-negativos de *Escherichia coli*. A) Bacilos visualizados após a Coloração de Gram. Fonte: WIKIPÉDIA, 2008. B) Colônias de *Escherichia coli* em PCA.

A *Escherichia coli* enteropatogênica, ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. Distinguem-se três estágios nas interações entre EPEC e a célula hospedeira: contato inicial, aderência frouxa e aderência firme (Figura 6). O contato inicial entre EPEC e a célula hospedeira é denominado adesão localizada ou LA (*localized adhesion*) (SILVA e SILVA, 2005). Há evidências que indicam que esse contato é mediado por fímbrias expressas na superfície bacteriana denominadas BFP (pili formador de feixes, do inglês: *bundle forming pili*), importante fator de virulência de EPEC (GIRÓN, HO e SCHOOLNIK, 1991; SILVA e SILVA,

2005). A aderência frouxa se inicia logo após o contato inicial entre EPEC e a célula alvo, com formação de LA. Seguem-se estágios que levam ao estabelecimento da lesão celular da infecção, denominada A/E. A A/E já constitui o estágio de aderência firme e caracteriza-se pela íntima aderência da bactéria à superfície das células epiteliais, seguida de destruição das microvilosidades, formação de pedestal e agregação polarizada de componentes do citoesqueleto situados abaixo do sítio de aderência (SILVA e SILVA, 2005; LORENZONI, 2009).

Biópsias do intestino de pacientes infectados com células de EPEC mostraram que as bactérias aderem à superfície do epitélio intestinal, na forma de microcolônias localizadas e, causam na célula infectada, lesões típicas (SILVA e SILVA, 2005). A aderência, da bactéria à célula do hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e infecção. Esta aderência compreende um fenômeno específico de reconhecimento entre o microrganismo e as células infectadas e ocorre através de adesinas fimbriais ou não fimbriais, com os receptores correspondentes na superfície celular. As fímbrias de *Escherichia coli* foram classificadas em três categorias: a) fímbrias não hemaglutinantes; b) fímbrias que têm a sua aglutinação com eritrócitos inibida pela D-manose, designadas manose-sensíveis (HAMS) ou fímbria tipo 1; e c) fímbrias que não tem a hemaglutinação inibida pela manose, chamadas manose resistente (HAMR). A presença da fímbria HAMS é comum em *E. coli* de origem fecal e urinária (BRITO et al., 2004; TOMA et al., 2008).

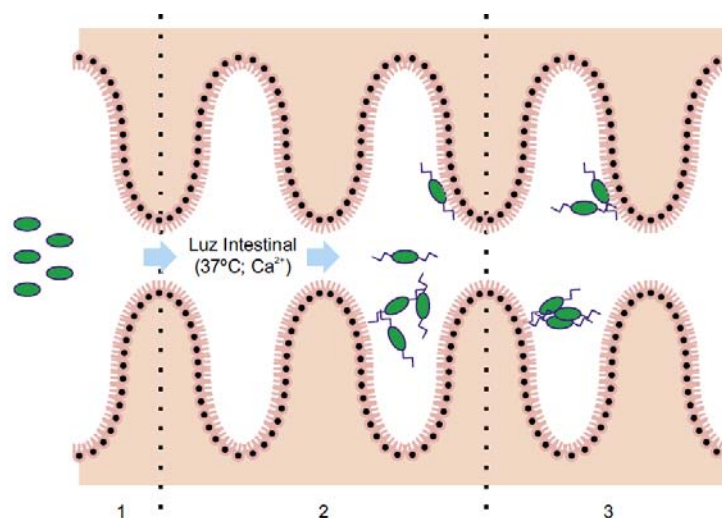


Figura 6 – Estágio inicial da infecção por EPEC. EPEC na luz intestinal (fase 1) por influência de condições locais, 37° C e Ca^{+2} que acionam a formação de feixes (fase 2) para aderência inicial da bactéria aos enterócitos e de agregação entre as bactérias do grumo aderido (fase 3). FONTE: SILVA e SILVA, 2005.

1.5.2 *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium

A *Salmonella* spp. é um bacilo Gram-negativo, também pertencente à família *Enterobacteriaceae*, fermentadora de glicose e não esporulada (FRANCO; LANDGRAF, 2005; TORQUATO, 2007). A patogenicidade desta bactéria varia de acordo com o tipo sorológico do microrganismo, e, com a idade e condições de saúde do hospedeiro (FRANCO; LANDGRAF, 2005). As salmonelas são, entre as enterobactérias responsáveis por gastroenterites, as mais frequentes pela sua distribuição mundial e facilidade de transmissão, causando números elevados de estados mórbidos e até de mortes em pacientes com resposta imunológica deficiente. É um dos microrganismos enteropatogênicos mais detectados em águas e alimentos contaminados, sob condições sanitárias precárias de higiene (TORQUATO, 2007). A *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium é um dos sorotipos mais comumente relacionado às infecções adquiridas por alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium é um importante agente causador de gastroenterite e constitui um grave problema de saúde pública. Em nosso meio, esta bactéria tem sido responsável por importantes infecções hospitalares. Nesses casos, a bactéria é frequentemente encontrada no sangue e pode originar focos de infecção em diferentes partes do organismo. Epidemiologicamente verifica-se, sob o ponto de vista de frequência, de disseminação hospitalar e de severidade, que a infecção por *S. enterica* sorotipo Typhimurium adquiriu, em nosso meio, características bem preocupantes. Determinantes dessas características parecem estar condicionadas ao elevado grau de desnutrição, à intensa pressão seletiva dos antimicrobianos, à superpopulação de crianças internadas e à grande frequência de infecção cruzada (GRISI et al., 1983).

Para a *Salmonella* spp. ter sucesso na colonização do hospedeiro e causar infecções no trato gastrintestinal, o microrganismo necessita vencer a acidez do estômago, a microflora endógena e a fermentação dos metabólitos bactericidas, além da barreira intestinal. Mesmo assim, as gastroenterites causadas por *Salmonella* spp. apresentam frequência de ocorrência alta, sendo responsáveis por milhares de mortes no mundo, todos os anos (PEREZ, 2008).

O resultado da infecção por *Salmonella* spp. é determinado pelo estado do hospedeiro e pela capacidade invasiva da bactéria, que é determinada pelos chamados fatores de virulência. Atualmente, os métodos moleculares têm se destacado para a determinação destes fatores, os quais envolvem proteínas, plasmídeos, toxinas, fímbrias e flagelos (PEREZ, 2008). Após os bacilos de *Salmonella* spp. chegarem ao intestino, estes microrganismos atravessam a mucosa intestinal e aderem às células do epitélio através de diversos mecanismos, especialmente fímbrias, que contribuem significativamente para a aderência das bactérias nas células epiteliais. Estudos microscópicos revelam que estes microrganismos invadem as células por processos mediados por endocitose bacteriana. Imediatamente após as bactérias aderirem às células apicais da superfície intestinal, ocorrem profundos rearranjos no citoesqueleto das células do hospedeiro, induzindo a subsequente formação de dobras na membrana plasmática que englobam a bactéria em grandes vesículas para interiorizá-las (PEREZ, 2008).

A aderência às células epiteliais é um processo fundamental para as bactérias sobreviverem e colonizarem o trato gastrointestinal. Para bactérias patogênicas, como *Salmonella* spp., a aderência ao epitélio é um passo crítico, uma vez que permite a liberação de enzimas e toxinas que iniciam diretamente o processo necrótico na célula-alvo, facilitando, assim, a invasão bacteriana. As células epiteliais do trato gastrointestinal estão protegidas por uma série de mecanismos. Um deles é o impedimento da instalação de infecções através da concorrência da aderência celular entre os microrganismos da microbiota normal e as bactérias patogênicas. Para causar infecção, estas bactérias devem aderir aos enterócitos. O passo inicial de aderência, no caso da *Salmonella* spp., é mediado por fímbrias que reconhecem determinados receptores na membrana das células eucarióticas (JANKOWSKA et al., 2008).

1.5.3 *Shigella flexneri*

As bactérias do gênero *Shigella* são microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, assim como as do gênero *Escherichia* e a *Salmonella*. São bastonetes Gram-negativos, imóveis, aeróbios facultativos, sem cápsula e não

formadores de esporos (SUDHA, DEVARAJ e DEVARAJ, 2001; PAULA, 2009). Este gênero inclui quatro espécies: *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* e *S. boydii*, sendo que a *Shigella flexneri* é a principal espécie causadora de shigelose endêmica em países em desenvolvimento (FRANCO; LANDGRAF, 2005; PAULA, 2009). A shigelose é responsável por mais de 500.000 mortes de crianças, por ano, nestes países (WILLER, LIMA e GIUGLIANO, 2004).

A *Shigella* spp. é frequentemente disseminada através do contato direto pessoa-pessoa, por transmissão fecal-oral, ou por consumo de alimentos ou águas contaminados. Este microrganismo alcança o cólon e o reto, é fagocitado por macrófagos, provoca apoptose destas células, atinge a porção basolateral das células epiteliais e as invade. A *Shigella* spp. consegue se mover de uma célula a outra através da formação de protusões de actina (PAULA, 2009).

Para muitos enteropatógenos, a aderência às células hospedeiras, como passo primordial na colonização intestinal, é mediada por adesinas fimbriais ou não-fimbriais. No entanto, para *Shigella* spp., a estrutura de aderência ainda não foi totalmente caracterizada. A capacidade de *S. flexneri* invadir células epiteliais tem sido amplamente estudada, no entanto, são necessários estudos sobre a importância da aderência no processo de colonização e patogênese desse microrganismo (WILLER, LIMA e GIUGLIANO, 2004).

O potencial patogênico da *Shigella* está correlacionado com a capacidade desse microrganismo de invadir e multiplicar-se no interior das células do epitélio do cólon intestinal. Embora a invasão seja o último evento observado, a etapa anterior que envolve a aderência microbiana é extremamente relevante e, portanto, deve ser considerada. A aderência de patógenos entéricos à mucosa do intestino delgado e do cólon é um evento inicial importante na colonização e desenvolvimento de doenças diarreicas. Tem sido sugerido que o muco, ou o seu componente predominante, as mucinas, podem permitir a entrada bacteriana no lúmen intestinal. A aderência ao hospedeiro, principalmente pela ligação ao muco, é o evento inicial do quadro infeccioso e considerada um importante mecanismo de virulência para *Shigella* spp., visto que este microrganismo demonstra uma forte aderência ao padrão de mucinas do cólon humano (SUDHA, DEVARAJ e DEVARAJ, 2001).

Willer, Lima e Giugliano (2004) demonstraram que outros componentes do leite humano, diferentes das imunoglobulinas, como, por exemplo, as glicoproteínas, poderiam desempenhar um papel importante contra a aderência e invasão de *S.*

flexneri, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* e *S. boydii*, e, por conseguinte, impedir a shigelose em lactentes. A invasão do epitélio do cólon humano por *Shigella flexneri* desencadeia um processo inflamatório e rompe a barreira do intestino. As células epiteliais intestinais invadidas por este microrganismo são as principais fontes de recrutamento de mediadores inflamatórios (PÉDRON, THIBAUT e SANSONETTI, 2003).

1.5.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Outros bacilos Gram-negativos importantes em infecções hospitalares, que não da família *Enterobacteriaceae*, são os também chamados de bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose (BGN-NF), sendo os exemplos mais comuns *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia* complexo e outras espécies (NOWAKONSKI, 2007). A maioria destes microrganismos é capaz de metabolizar os carboidratos pela via oxidativa e, por isso, são também denominados oxidativos ou sacarolíticos. As bactérias que não utilizam carboidratos pela fermentação ou oxidativamente são conhecidas bioquimicamente como inertes ou não oxidativos (BALAN, 2007). A *Pseudomonas aeruginosa* é um bastonete reto, flagelado e aeróbio. É capaz de crescer em colônias com formação de biofilme. Esse agrupamento de indivíduos em microcolônias unidas por uma matriz exopolissacarídea propicia a formação de uma estrutura altamente hidrofóbica que confere resistência à comunidade de bactérias, que são altamente resistentes à variação de temperatura de 4°C a 42°C. Produzem os pigmentos pioverdina e piocianina (raras amostras não produzem estes pigmentos). Esse microrganismo é oportunista, causador de bacteremias severas, de morte em indivíduos debilitados, de infecções urinárias, endocardites, pneumonias e meningites (SARTORI, 2005; VASCONCELOS, 2005; BALAN, 2007).

A *Pseudomonas aeruginosa* é muito frequente em infecções hospitalares devido a sua capacidade de sobreviver por longos períodos em superfícies, tendo necessidades nutricionais mínimas, e com grande tolerância às variações ambientais (NOWAKONSKI, 2007). Raramente *P. aeruginosa* causa infecções comunitárias em indivíduos saudáveis, entretanto, essa espécie bacteriana assume

importante papel como agente etiológico de infecções nosocomiais. Na maioria dos casos, o processo infeccioso tem início com algum tipo de alteração ou destruição de barreiras físicas, entre as quais se evidenciam as utilizações de cateter urinário, sonda orotraqueal, realização de cirurgias, pacientes que sofreram queimaduras e pacientes que fazem uso de drogas imunossupressoras (BALAN, 2007).

P. aeruginosa tem também grande capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos, além de mecanismos de escape da defesa do hospedeiro, que geralmente é exposto ao uso de técnicas invasivas com fins diagnósticos e/ou terapêuticos. Este microrganismo é amplamente distribuído no ambiente, com predileção por locais úmidos. No homem, a colonização ocorre preferencialmente no períneo, axilas e ouvido e, no ambiente hospitalar, em equipamentos respiratórios, soluções de limpeza, pias e vegetais (NOWAKONSKI, 2007).

Diversos são os fatores de virulência encontrados em *P. aeruginosa* que permitem a colonização, a sobrevivência e a invasão dos tecidos do hospedeiro. Esse microrganismo produz dois tipos de adesinas protéicas: a *pili* e a adesina não piliada. Dentre os principais fatores destaca-se a *pili*, que facilita a aderência nos epitélios; uma exoenzima; outras adesinas não derivadas da *pili*, que reforçam esta ligação; e, o flagelo, que igualmente auxilia no processo de aderência. Amostras de *P. aeruginosa* não flageladas mostram virulência atenuada. Estas estruturas aumentam a virulência do microrganismo por permitir sua aderência em superfícies sólidas e por aumentar sua resistência em relação às células fagocitárias (EUZÉBY, 1997; STEHLING, 1999). Os anticorpos monoclonais específicos para regiões definidas do monômero da pilina inibiram a aderência bacteriana em células epiteliais e traqueais, reforçando o envolvimento da *pili* na aderência de *P. aeruginosa* (STEHLING, 1999).

McEwan et al. (2008) estudaram monossacarídeos, possíveis redutores da aderência de *Pseudomonas aeruginosa*, em células córneas de cães. A média de redução de aderência para os açúcares, na concentração de 0,1%, foi de 40,2% para dextrose, 30,8% para L-ramnose, 25,6% para D-galactose e 19,4% para D-manose. Quando D-galactose, D-manose e L-ramnose foram utilizadas em associação, na concentração de 0,1%, a redução média de aderência foi 52,9%. Estes monossacarídeos estudados podem ter um potencial papel no combate de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* em caninos.

1.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os antimicrobianos são fármacos utilizados terapêuticamente com o intuito de provocar a morte ou de inibir o crescimento de determinado agente microbiano. Eles podem ser originados de substâncias oriundas de vegetais, substâncias sintéticas ou mesmo de substâncias produzidas pelos próprios microrganismos (ALTERTHUM e TRABULSI, 2003). Caso o microrganismo seja sensível a um determinado antimicrobiano, este pode provocar dois tipos de efeitos: morte da bactéria (efeito bactericida) ou interrupção do seu crescimento e reprodução (efeito bacteriostático). Estes efeitos são determinados por mecanismos de ação primários ou secundários dos fármacos sobre o agente microbiano e são variáveis com a concentração do antimicrobiano no meio em que se encontra o microrganismo (ALTERTHUM, 2004).

Segundo Eloff (1998), a técnica mais amplamente utilizada em ensaios microbiológicos, para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), é a de diluição seriada da substância-teste em tubos, seguidos da adição do microrganismo e da observação da turbidez como indicador do crescimento. Alternativamente, a avaliação da atividade antimicrobiana vem sendo realizada utilizando-se a técnica de diluição em microplacas. Esta é uma metodologia adequada para tal finalidade, com aspectos vantajosos em relação à técnica de diluição em tubos, como, por exemplo, a utilização de pequenas quantidades da substância-teste e de meios de culturas, e, a possibilidade de se testar mais de uma substância bem como mais de um microrganismo diferente em um mesmo ensaio (MORAES, 2006). Ambas as técnicas, que determinam a concentração inibitória mínima, são quantitativas, pois possibilitam demonstrar qual a mínima concentração necessária de uma substância para inibir o crescimento bacteriano (MORAES, 2006). Diz-se que a bactéria é resistente a um determinado antimicrobiano quando esta é capaz de crescer *in vitro* na presença da concentração inibitória mínima do fármaco em questão (SILVA, 2008).

1.7 PROPRIEDADE ANTIADERENTE

O potencial patogênico dos microrganismos envolve vários fatores de virulência, dentre os quais tem sido destacada a capacidade de aderência e agregação desses organismos. A aderência bacteriana a diferentes tipos celulares leva à formação de uma ponte de ligação entre colonizadores primários e tardios (JÚNIOR, LANDUCCI e CAMPOS, 2002), que, juntos, causam a infecção local. Interações inespecíficas, como forças iônicas e hidrofobicidade celular, também contribuem para as etapas iniciais da aderência bacteriana às células do hospedeiro, acompanhadas de interações mais específicas entre adesinas bacterianas e receptores teciduais (JÚNIOR, LANDUCCI e CAMPOS, 2002).

Além da aderência celular *in-vivo*, no hospedeiro, a aderência bacteriana também tem importância fundamental na formação de biofilmes na superfície de biomateriais. Sob determinadas condições, os microrganismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam o processo de crescimento celular. Essa multiplicação dá origem a colônias e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, forma-se o que se chama de biofilme, ou seja, complexos ecossistemas microbiológicos embebidos em uma matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície. Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, que formam uma espécie de crosta, debaixo da qual, os microrganismos continuam a crescer, formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos. No biofilme os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos, como aqueles usados no procedimento de higienização (MACEDO, 2000).

Dentre os microrganismos patogênicos que podem participar de processos de aderência e gerar problemas de saúde pública ou mesmo de ordem econômica, ressalta-se: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* e *Bacillus cereus* (MACEDO, 2000). Dentro deste contexto, foi realizada a escolha de algumas destas bactérias para se avaliar seus padrões de aderência frente à substância-teste deste trabalho, o xilitol.

1.8 COLONIZAÇÃO DE MATERIAIS MÉDICO-HOSPITALARES

A aderência de microrganismos à superfície de um material médico-hospitalar é um passo essencial na instalação de diferentes infecções no hospedeiro, contudo, a estrutura física destes materiais e as interações moleculares que regem a aderência bacteriana nestas superfícies ainda são pouco conhecidas. Tanto interações específicas e não específicas podem desempenhar um papel importante na capacidade de uma célula bacteriana anexar ou resistir à aderência na superfície do biomaterial (KATSIKOIANNI e MISSIRLIS, 2004). Mais de 99% das bactérias presentes no interior desses sistemas vivem em microcolônias dentro de biofilmes que são aderentes às superfícies inertes. Muitas das bactérias podem se instalar quando um biomaterial é implantado ou podem ser transportadas para a superfície do biomaterial por uma bacteremia já instalada, mas, uma vez lá, a aderência é provavelmente o fator de virulência bacteriano que reforça a resistência contra antimicrobianos e contra as defesas do próprio organismo (GRISTINA e COSTERTON, 1985).

A primeira fase da aderência bacteriana em biomateriais consiste na atração inicial das células para a superfície seguida de adsorção e ligação. Geralmente as bactérias se deslocam e são movidas à superfície através de um material (veículo) e de forças físicas como, por exemplo, forças gravitacionais, força de Van der Waals, interação hidrofóbicas, efeito da carga eletrostática da superfície e movimento browniano. Na segunda fase de aderência, reações moleculares e específicas entre a superfície da estrutura bacteriana e substratos da superfície de biomateriais tornam-se predominantes. Isto implica em uma firme aderência da bactéria à superfície pela função de estruturas bacterianas que incluem cápsulas e fímbria ou pili, com função de adesinas. Por exemplo, *Staphylococcus epidermidis* possui vários polissacarídeos que funcionam como adesinas permitindo a aderência desta bactéria à superfície de vários biomateriais e às proteínas de tecidos do hospedeiro (Figura 7). As mais importantes seriam uma galactose rica em polissacarídeos capsulares (PS/A), um antígeno composto de N-acetil-glucosamina (SAA) e *accumulation-associated protein* (AAP) (KATSIKOIANNI e MISSIRLIS, 2004).



Figura 7 – Modelo esquemático das fases envolvidas na formação do biofilme de *Staphylococcus epidermidis*. I) Ligação de células bacterianas a uma superfície; II) Ligação de outras células na primeira camada de bacilos aderidos (aderência célula-célula e proliferação); III) Biofilme bacteriano formado e desprendimento de células. FONTE: Adaptado de KATSIKOIANNI e MISSIRLIS, 2004.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana e a propriedade antiaderente do xilitol sobre diferentes cepas causadoras de infecções humanas e colonizadoras de biomateriais.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana do xilitol, nas concentrações de 0,5%; 2,5% e 5,0% (p/v), frente às cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* clínica (EPEC), *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Shigella flexneri* clínica e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

- Verificar *in vitro* a propriedade antiaderente do xilitol, nas concentrações de 0,5%; 2,5% e 5,0% (p/v), sobre as cepas supra-citadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA) localizado na Faculdade de Farmácia (FFB) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). As análises de microscopia eletrônica de varredura foram executadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) – Ilha do Fundão.

3.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas cepas provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella flexneri* ATCC 12022 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; e cepas selvagens, de proveniência clínica, isoladas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU/UFJF): *Escherichia coli* clínica (EPEC), *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica e *Shigella flexneri* clínica. Estas cepas foram mantidas em meio de cultura adequado para conservação (*Skim Milk*) e armazenadas em freezer -20°C. As células foram cultivadas em meio de cultivo agar caseína soja (TSA) a 37°C por 24 h, sendo posteriormente armazenadas em geladeira (4°C). Repiques da cultura foram realizados em intervalos regulares de 15 dias e, após o 6º repique, nova alíquota do *Skim Milk* foi utilizada.

3.2 XILITOL

Foi utilizado xilitol produzido por via química, com teor de pureza maior do que 98% (Fluka BioChemika, Suíça).

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizados os testes de atividade antimicrobiana e de propriedade antiaderente para cada cepa-teste, utilizando-se o xilitol, em ambos os ensaios, nas diferentes concentrações: 0,5%; 2,5% e 5,0% (p/v) (Figura 8).

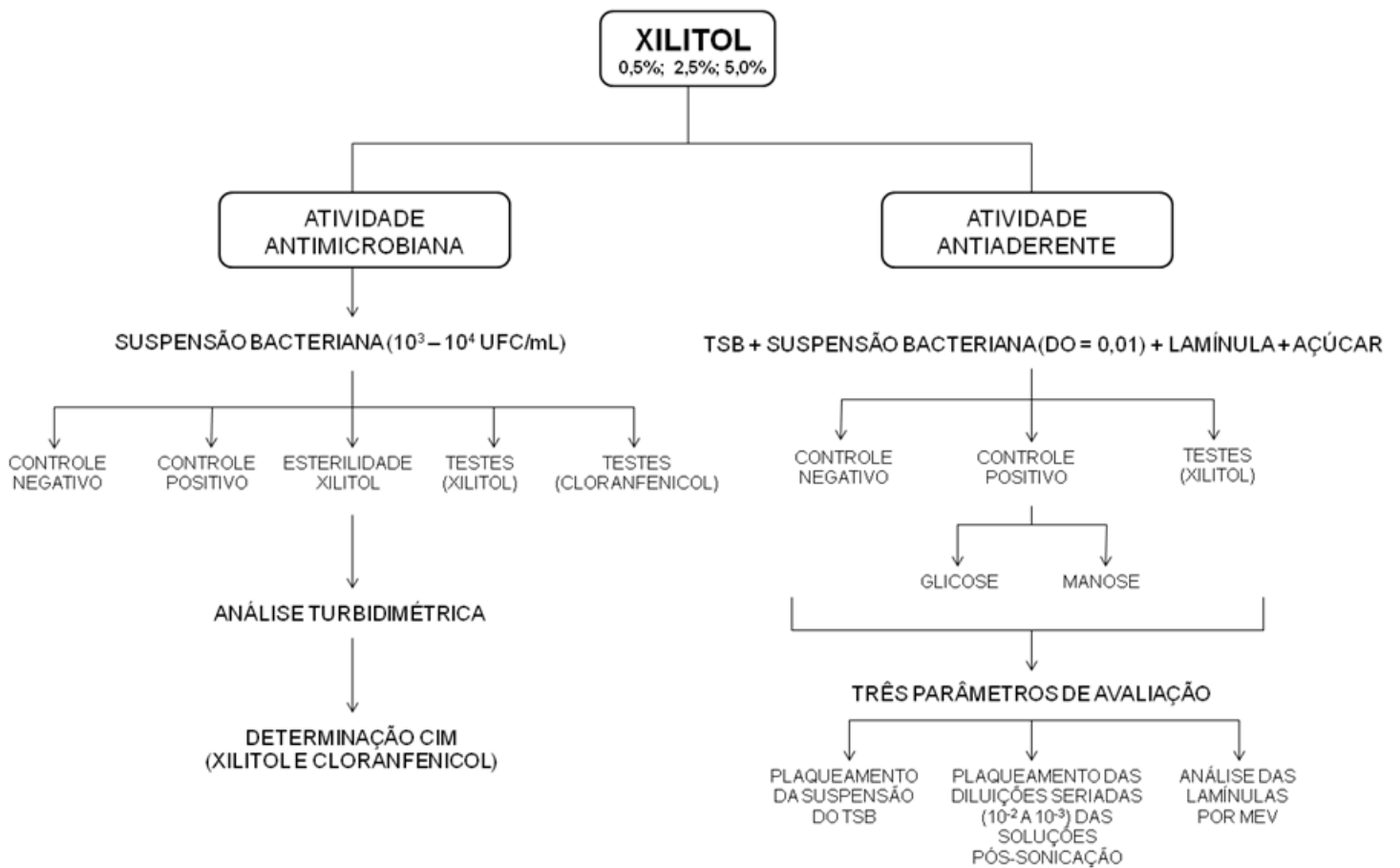


Figura 8 – Fluxograma ilustrativo do teste de atividade antimicrobiana e do teste de aderência realizados para cada cepa de interesse.

3.3.1 Atividade antimicrobiana

Foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo Müller Hinton (CMH), através da qual, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) por análise turbidimétrica. Uma suspensão bacteriana de cada cepa foi preparada com solução

fisiológica estéril (cloreto de sódio - NaCl 9,0 g/l), a 25% de transmitância, com o auxílio de um espectrofotômetro (Libra S12, Biochrom, Dinamarca). A suspensão microbiana padronizada foi submetida à diluição seriada com solução fisiológica estéril. Após um período de 24 h, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC's), em meio de cultivo *Tryptone Soy Agar* (TSA), a fim de se obter uma suspensão de $10^3 - 10^4$ UFC/mL (adaptado de USP, 1985; CANDAN et al., 2003).

Para o controle negativo, foram adicionados nos poços das microplacas, 100µL de CMH estéril. Para o controle positivo, foram empregados 100µL de CMH inoculado. No preparo dos poços dos grupos-teste, foram acrescentados 100µL CMH inoculado e 100 µL de xilitol nas concentrações 0,5%; 2,5% e 5,0% (p/v). Para o controle da esterilização das soluções de xilitol, foram empregados 100µL de CMH estéril e 100µL de xilitol nas diferentes concentrações: 0,5%; 2,5% e 5,0% (p/v). O cloranfenicol foi utilizado como fármaco de referência, sendo empregados 100µL de CMH inoculado e 100µL de cloranfenicol nas concentrações 0,025; 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. A microplaca foi incubada em ambiente aeróbico, à temperatura de 37°C por 24 h. A CIM foi determinada através da observação de turvação dos poços, após o período de incubação. O procedimento foi realizado em triplicata.

3.3.2 Propriedade antiaderente

As colônias de cada uma das cepas testadas foram ressuspensas em salina estéril e 200 µL destas suspensões foram transferidos para 5 mL de caldo TSB, os quais foram incubados a 37°C por 24 h. Após este período, uma alíquota do TSB crescido foi diluída na proporção de 1:10 (v/v) com tampão fosfato 0,1M pH=7,4 (13,6 g de fosfato dibásico de potássio e 4,0 g de fosfato monobásico de potássio diluídos em água destilada quantidade suficiente para 1 L de solução). Foram calculados os volumes de inóculo correspondente à densidade ótica de 0,01 ($\lambda=600$ nm) para cada cepa (adaptado de FERREIRA, 2007).

No grupo-teste, os inóculos foram adicionados aos tubos com capacidade para 50 mL, nos quais continham 25 mL de TSB, uma lamínula de vidro (corpo de prova) e xilitol 0,5%; 2,5% e 5,0% (p/v). Como controles negativos, três condições

foram empregadas: a) lamínula de vidro previamente limpa com solução desengordurante; b) lamínula de vidro em TSB; e, c) somente TSB. Para o controle positivo foram empregados tubos que continham a suspensão bacteriana, TSB, lamínula de vidro e 1) manose 5,0% (p/v) e 2) glicose 5,0% (p/v). Todos estes sistemas foram incubados a 37° C por 24 h (adaptado de FERREIRA, 2007).

3.3.2.1 Avaliação do crescimento bacteriano

Foi inoculado em TSA, 1 mL das suspensões bacterianas crescidas em TSB, de cada um dos referidos sistemas. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e, posteriormente, foi realizada, em duplicata, a contagem das UFC's (FERREIRA, 2007).

3.3.2.2 Avaliação do crescimento bacteriano pós-sonicação

As lamínulas foram retiradas de cada sistema e acondicionadas individualmente. Logo após, as lamínulas foram lavadas (2 vezes) com 10 mL de tampão fosfato 0,1M pH=7,4 e, em seguida, foram acrescentados 10 mL do mesmo tampão aos tubos, os quais foram sonicados (2 ciclos de 10 min) a 40 ± 6 KHz. Foram preparadas diluições seriadas com cada solução pós-sonicação (10^{-2} a 10^{-3}), as quais foram inoculadas (1 mL) em TSA. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e, posteriormente, foi realizada, em duplicata, a contagem das UFC's, a fim se de avaliar o crescimento das colônias que não aderiram à lamínula (LOCATELLI et al., 2004; FERREIRA, 2007). A diluição que ofereceu melhores condições de contagem foi a empregada para a realização dos protocolos experimentais.

3.3.2.3 Avaliação das lamínulas por MEV

Finalizada a sonicação, as lamínulas foram novamente lavadas (2 vezes) com 10 mL de tampão fosfato 0,1M pH=7,4 e fixadas com glutaraldeído 1% por 12 h. Após este período, as lamínulas foram novamente lavadas (2 vezes) com 10 mL de tampão fosfato 0,1M pH=7,4 e desidratadas com concentrações crescentes de etanol (50% a 100%), com intervalo de 20 minutos entre cada troca. Em seguida, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente e acondicionadas em envelopes de papel sulfite, previamente identificados e esterilizados. Posteriormente, as lamínulas foram metalizadas em metalizadora (Balzers Union FL – 9496, Balzers, Alemanha) com 2 nm de ouro, durante 2 minutos (Figura 9) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (JSM 5310, Jeol, Japão) em alto vácuo, no modo de elétrons secundários (Figura 10) (LOCATELLI et al., 2004; FERREIRA, 2007).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da contagem de colônias que não aderiram à lamínula foram expressos como média \pm desvio padrão (n=2). Para avaliar o crescimento bacteriano pós-sonicação, foi realizada a comparação das médias dos números de UFC's desprendidas, por cada tratamento experimental, pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste *post hoc* de Tukey, com nível de significância igual a 95%. A análise de correlação entre as concentrações de xilitol e o número de células desprendidas foi realizada pelo teste paramétrico de *Pearson*. Para esses cálculos estatísticos foi empregado o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 14.0.



Figura 9 – Metalizadora utilizada para metalização das lamínulas no teste de aderência.



Figura 10 – Microscópio eletrônico de varredura utilizado para visualização das lamínulas no teste de aderência.

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para todas as cepas testadas, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* clínica (EPEC), *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Shigella flexneri* clínica e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, não foi observada a inibição do crescimento bacteriano nas concentrações de xilitol de 0,5%; 2,5%, 5,0% (p/v), uma vez que foi encontrada uma turbidez comparável a do controle positivo. Em contrapartida, não foi observada a turvação do controle negativo e do controle da esterilidade do xilitol nas três concentrações.

A turvação nos poços da microplaca contendo cloranfenicol ocorreu de maneira diferente. Para a cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 a CIM foi de 0,25 µg/mL. Para as cepas *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica, *Shigella flexneri* ATCC 12022 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 a CIM foi de 25 µg/mL. Para as cepas *Escherichia coli* clínica (EPEC) e *Shigella flexneri* clínica a CIM foi de 250 µg/mL.

4.2 PROPRIEDADE ANTIADERENTE

4.2.1 Crescimento bacteriano

A contagem das células da suspensão bacteriana do TSB, onde as bactérias foram cultivadas nos diferentes tratamentos experimentais, foi realizada a fim de avaliar se o xilitol era capaz de inibir o crescimento de alguma cepa estudada, o que reforçaria os resultados encontrados nos ensaios de atividade antimicrobiana. Para todas as cepas testadas, não foi possível realizar a contagem das (UFC's), já que em todas as placas contendo o meio de cultivo TSA e a suspensão bacteriana do TSB formou-se uma massa celular incontável. Apenas no controle negativo do TSA

não foi observado crescimento celular, o que ratifica a esterilidade do processo (Figura 11).

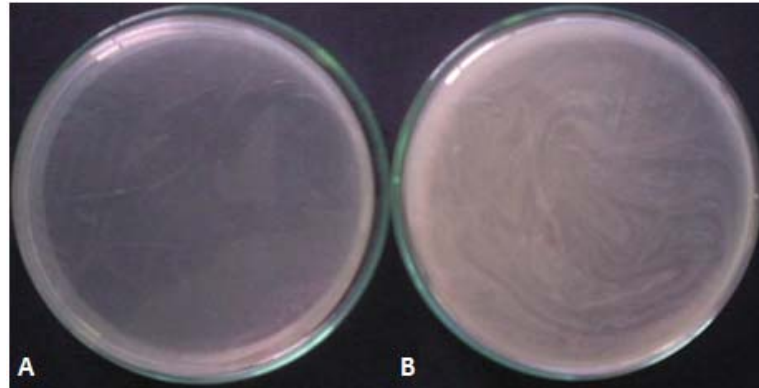


Figura 11 – Placas de avaliação do crescimento celular, após incubação das suspensões bacterianas em TSB, de cada tratamento experimental: A) Controle negativo (TSA) representando a ausência de crescimento celular, B) Massa celular incontável encontrada nas placas de todos os tratamentos experimentais.

4.2.2 Desprendimento bacteriano

A demonstração do número de células desprendidas da superfície de aderência, ou seja, a quantidade de bactérias que não aderiram ao corpo de prova (lamínula) é mais um parâmetro para se avaliar a propriedade antiaderente do xilitol. Este deve ser considerado em conjunto com o resultados visualizados na MEV.

4.2.2.1 *Escherichia coli* ATCC 8739

Houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de UFC's desprendidas pelo grupo-controle glicose 5,0% *versus* xilitol (0,5%; 2,5% e 5,0%); pelo grupo-controle manose 5,0% *versus* xilitol (0,5%; 2,5% e 5,0%) e pelos tratamentos com xilitol 0,5% *versus* xilitol (2,5% e 5,0%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o desprendimento de bacilos pelos grupos-controle (glicose e manose) ($p=0,104$) e nem pelos tratamentos com xilitol 2,5%

versus xilitol 5,0% ($p=0,074$). Foi verificada uma correlação positiva ($r=0,969$) entre as três concentrações de xilitol e o desprendimento bacteriano, o que demonstra a relação de dose-dependência. Os resultados da contagem das UFC's desprendidas da cepa *E.coli* ATCC 8739 estão demonstrados na Tabela 3. As placas que representam o controle negativo, os controles-positivo e os tratamentos com xilitol, incubadas simultaneamente com meio de cultivo TSA e com a solução pós-sonicação na diluição 10^{-2} , estão demonstradas na Figura 12.

Tabela 3 – Desprendimento bacteriano de *E. coli* ATCC 8739 nos tratamentos experimentais.

TRATAMENTOS	UFC's DESPRENDIDAS
Controle negativo (TSA)	0
Controle positivo (glicose 5,0%)	> 500 ^a
Controle positivo (manose 5,0%)	436 ± 34 ^b
Xilitol 0,5 %	89 ± 6 ^{a,b,c,d}
Xilitol 2,5%	187 ± 12 ^{a,b,c}
Xilitol 5,0%	257 ± 30 ^{a,b,d}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=2 placas). Médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de ANOVA seguido de teste *post hoc* de Tukey (^{a,b,d} $p<0,001$; ^c $p<0,05$).

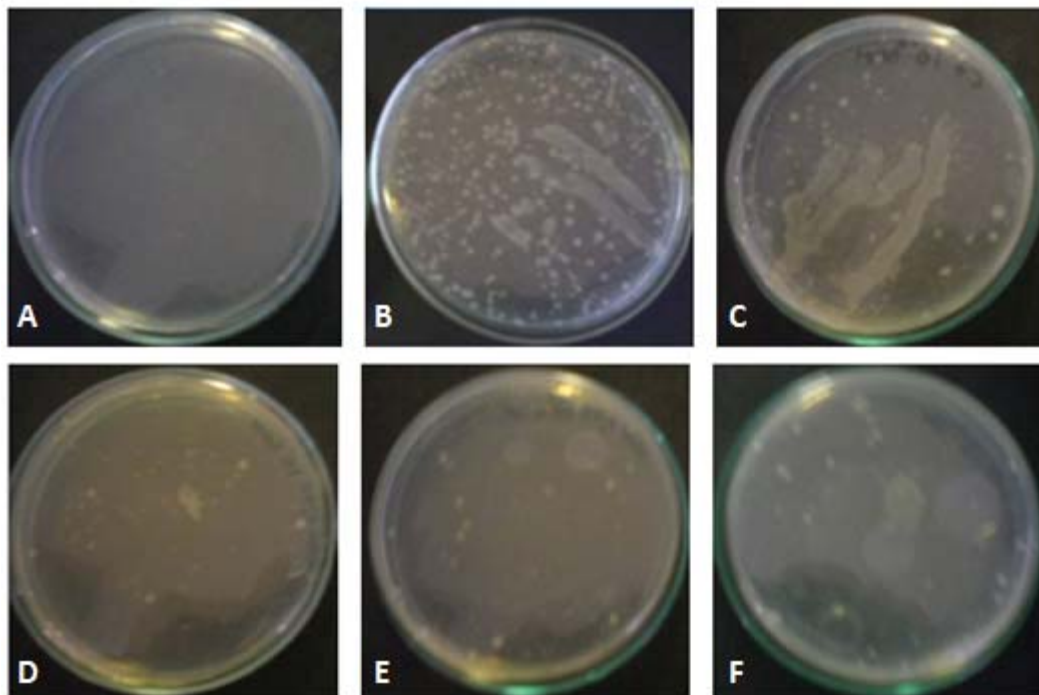


Figura 12 – Despreendimento de UFC's de *E. coli* ATCC 8739 pós-sonicação submetidas aos tratamentos experimentais: A) controle negativo, B) glicose 5,0%, C) manose 5,0%, D) xilitol 0,5%, E) xilitol 2,5%, F) xilitol 5,0%.

4.2.2.2 *Escherichia coli* clínica (EPEC)

Houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de UFC's despreendidas pelos grupos-controle (glicose e manose); pelo grupo-controle glicose 5,0% *versus* xilitol 0,5%; pelo grupo-controle manose 5,0% *versus* xilitol (0,5%; 2,5% e 5,0%) e pelos tratamentos com xilitol 0,5% *versus* xilitol (2,5% e 5,0%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o despreendimento de bacilos pelo grupo-controle glicose 5,0% *versus* xilitol 2,5% ($p=1,00$) e 5,0% ($p=0,794$) e nem pelos tratamentos com xilitol 2,5% *versus* xilitol 5,0% ($p=0,692$). Foi verificada uma correlação positiva ($r=0,877$) entre as três concentrações de xilitol e o despreendimento bacteriano, o que demonstra a relação de dose-dependência. Os resultados da contagem das UFC's despreendidas da cepa *E.coli* clínica (EPEC) estão demonstrados na Tabela 4. As placas que representam o controle negativo, os controles-positivo e os tratamentos com xilitol, incubadas simultaneamente com meio de cultivo TSA e com a solução pós-sonicação na diluição 10^{-3} , estão demonstradas na Figura 13.

Tabela 4 – Desprendimento bacteriano de *E. coli* clínica (EPEC) nos tratamentos experimentais.

TRATAMENTOS	UFC's DESPRENDIDAS
Controle negativo (TSA)	0
Controle positivo (glicose 5,0%)	286 ± 11 ^{a,b}
Controle positivo (manose 5,0%)	16 ± 3 ^{a,c}
Xilitol 0,5 %	198 ± 28 ^{b,c,d,e}
Xilitol 2,5%	282 ± 20 ^{c,d}
Xilitol 5,0%	311 ± 30 ^{c,e}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=2 placas). Médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de ANOVA seguido de teste *post hoc* de Tukey (^{a,c} p<0,001; ^{b,d,e} p<0,05).

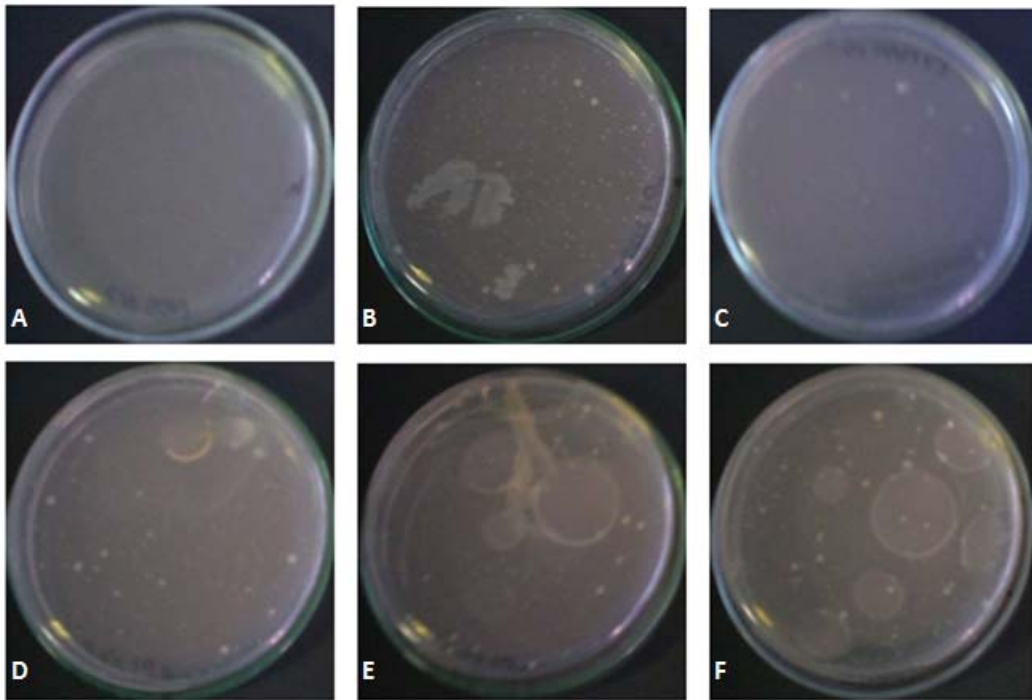


Figura 13 – Desprendimento de UFC's de *E. coli* clínica (EPEC) pós-sonicação submetidas aos tratamentos experimentais: A) controle negativo, B) glicose 5,0%, C) manose 5,0%, D) xilitol 0,5%, E) xilitol 2,5%, F) xilitol 5,0%.

4.2.2.3 *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica

Houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de UFC's desprendidas pelo grupo-controle glicose 5,0% *versus* xilitol (0,5%; 2,5% e 5,0%) e pelo grupo-controle manose 5,0% *versus* xilitol (0,5%; 2,5% e 5,0%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o desprendimento de bacilos pelos grupos-controle (glicose e manose) ($p=0,309$) e nem entre os tratamentos com xilitol: 0,5% *versus* 2,5% ($p=0,848$); 0,5% *versus* 5,0% ($p=0,923$) e 2,5% *versus* 5,0% ($p=1,00$). Os resultados da contagem das UFC's desprendidas da cepa *S. enterica* sorotipo Typhimurium clínica estão demonstrados na Tabela 5. As placas que representam o controle negativo, os controles-positivo e os tratamentos com xilitol, incubadas simultaneamente com meio de cultivo TSA e com a solução pós-sonicação na diluição 10^{-3} , estão demonstradas na Figura 14.

Tabela 5 – Desprendimento bacteriano de *S. enterica* sorotipo Typhimurium clínica nos tratamentos experimentais.

TRATAMENTOS	UFC's DESPRENDIDAS
Controle negativo (TSA)	0
Controle positivo (glicose 5,0%)	442 ± 63 ^a
Controle positivo (manose 5,0%)	357 ± 6 ^b
Xilitol 0,5 %	65 ± 4 ^{a,b}
Xilitol 2,5%	23 ± 2 ^{a,b}
Xilitol 5,0%	31 ± 1 ^{a,b}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=2 placas). Médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de ANOVA seguido de teste *post hoc* de Tukey (^a $p<0,001$; ^b $p<0,05$).

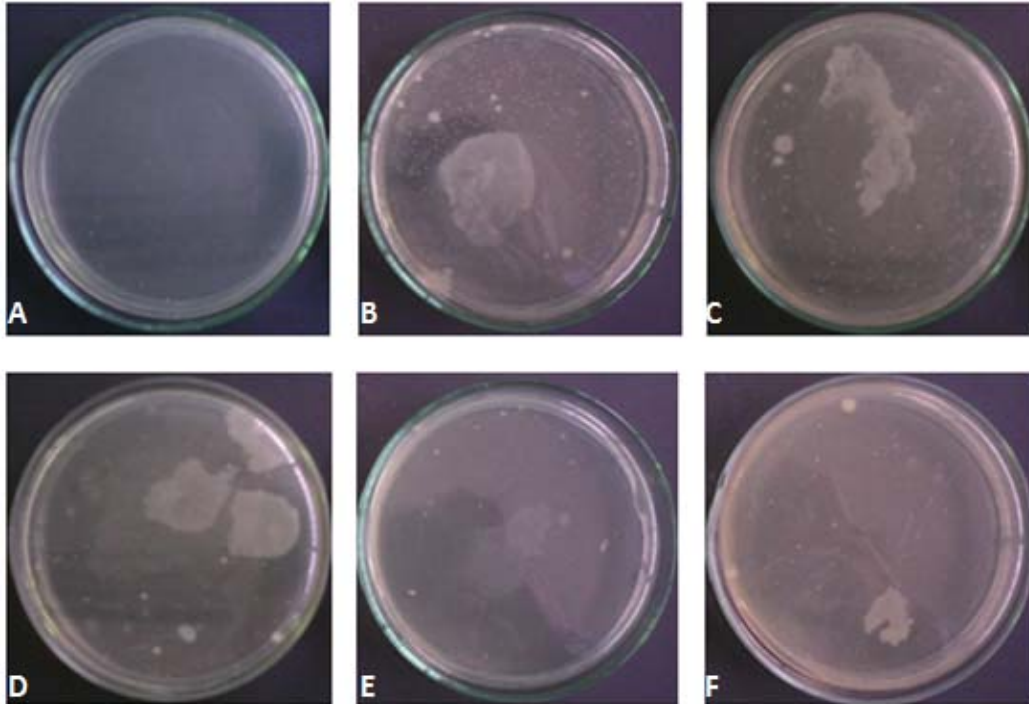


Figura 14 – Desprendimento de UFC's de *S. enterica* sorotipo Typhimurium clínica pós-sonicação submetidas aos tratamentos experimentais: A) controle negativo, B) glicose 5,0%, C) manose 5,0%, D) xilitol 0,5%, E) xilitol 2,5%, F) xilitol 5,0%

4.2.2.4 *Shigella flexneri* ATCC 12022

Houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de UFC's desprendidas pelos grupos-controle (glicose e manose); pelo grupo-controle glicose 5,0% versus xilitol (0,5%; 2,5% e 5,0%); pelo grupo-controle manose 5,0% versus xilitol (0,5% e 2,5%) e pelos tratamentos com xilitol 5,0% versus xilitol (0,5% e 2,5%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o desprendimento de bacilos pelo grupo-controle manose 5,0% versus xilitol 5,0% ($p=0,998$) e nem pelos tratamentos com xilitol 0,5% versus xilitol 2,5% ($p=0,302$). Foi verificada uma correlação negativa ($r=-0,941$) entre as três concentrações de xilitol e o desprendimento bacteriano. Os resultados da contagem das UFC's desprendidas da cepa *S. flexneri* ATCC 12022 estão demonstrados na Tabela 6. As placas que representam o controle negativo, os controles-positivo e os tratamentos com xilitol, incubadas simultaneamente com meio de cultivo TSA e com a solução pós-sonicação na diluição 10^{-2} , estão demonstradas na Figura 15.

Tabela 6 – Desprendimento bacteriano de *S. flexneri* ATCC 12022 nos tratamentos experimentais.

TRATAMENTOS	UFC's DESPRENDIDAS
Controle negativo (TSA)	0
Controle positivo (glicose 5,0%)	15 ± 1 ^{a,b}
Controle positivo (manose 5,0%)	56 ± 2 ^{a,c}
Xilitol 0,5 %	131 ± 3 ^{b,c,d}
Xilitol 2,5%	120 ± 6 ^{b,c,e}
Xilitol 5,0%	58 ± 6 ^{b,d,e}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=2 placas). Médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de ANOVA seguido de teste *post hoc* de Tukey (^{a,b,c,d,e} p<0,001).

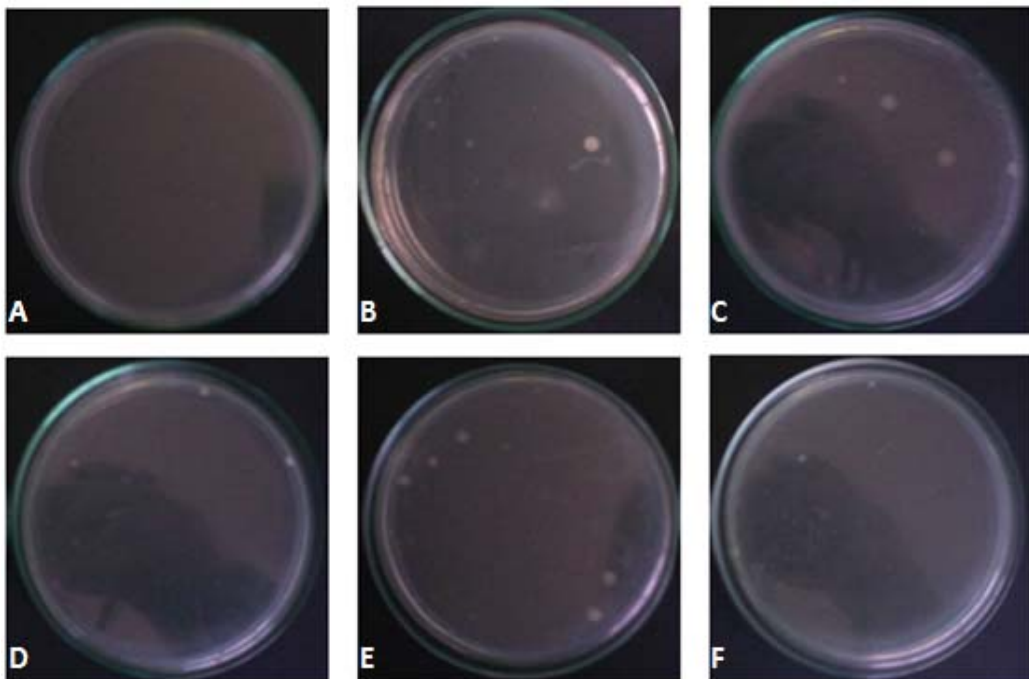


Figura 15 – Desprendimento de UFC's de *S. flexneri* ATCC 12022 pós-sonicação submetidas aos tratamentos experimentais: A) controle negativo, B) glicose 5,0%, C) manose 5,0%, D) xilitol 0,5%, E) xilitol 2,5%, F) xilitol 5,0%.

4.2.2.5 *Shigella flexneri* clínica

Houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de UFC's desprendidas pelo grupo-controle glicose 5,0% versus xilitol (0,5%; 2,5% e 5,0%);

pelo grupo-controle manose 5,0% *versus* xilitol (0,5%; 2,5% e 5,0%) e entre os tratamentos com xilitol (0,5%; 2,5% e 5,0%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o desprendimento de bacilos pelos grupos-controle (glicose e manose) ($p=0,973$). Foi verificada uma correlação negativa ($r=-0,890$) entre as três concentrações de xilitol e o desprendimento bacteriano. Os resultados da contagem das UFC's desprendidas da cepa *S. flexneri* clínica estão demonstrados na Tabela 7. As placas que representam o controle negativo, os controles-positivo e os tratamentos com xilitol, incubadas simultaneamente com meio de cultivo TSA e com a solução pós-sonicação na diluição 10^{-3} , estão demonstradas na Figura 16.

Tabela 7 – Desprendimento bacteriano de *S. flexneri* clínica nos tratamentos experimentais.

TRATAMENTOS	UFC's DESPRENDIDAS
Controle negativo (TSA)	0
Controle positivo (glicose 5,0%)	8 ± 0^a
Controle positivo (manose 5,0%)	15 ± 1^b
Xilitol 0,5 %	$779 \pm 15^{a,b,c}$
Xilitol 2,5%	$146 \pm 2^{a,b,c}$
Xilitol 5,0%	$56 \pm 6^{a,b,c}$

Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=2 placas). Médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de ANOVA seguido de teste *post hoc* de Tukey (^{a,b} $p<0,05$; ^c $p<0,001$).

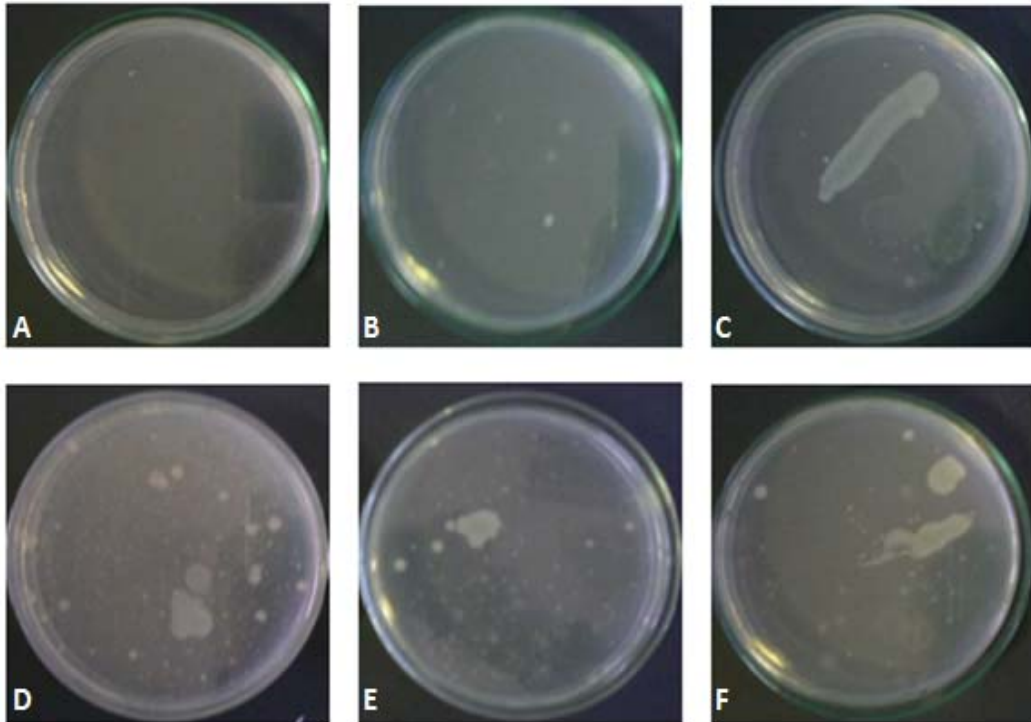


Figura 16 – Desprendimento de UFC's de *S. flexneri* clínica pós-sonicação submetidas aos tratamentos experimentais: A) controle negativo, B) glicose 5,0%, C) manose 5,0%, D) xilitol 0,5%, E) xilitol 2,5%, F) xilitol 5,0%.

4.2.2.6 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de UFC's desprendidas por todos os tratamentos experimentais. Foi verificada uma correlação positiva ($r=0,971$) entre as três concentrações de xilitol e o desprendimento bacteriano, o que demonstra a relação de dose-dependência. Os resultados da contagem das UFC's desprendidas da cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027 estão demonstrados na Tabela 8. As placas que representam o controle negativo, os controles-positivo e os tratamentos com xilitol, incubadas simultaneamente com meio de cultivo TSA e com a solução pós-sonicação na diluição 10^{-3} , estão demonstradas na Figura 17.

Tabela 8 – Desprendimento bacteriano de *P. aeruginosa* ATCC 9027 nos tratamentos experimentais.

TRATAMENTOS	UFC's DESPRENDIDAS
Controle negativo (TSA)	0
Controle positivo (glicose 5,0%)	459 ± 26 ^a
Controle positivo (manose 5,0%)	3616 ± 41 ^a
Xilitol 0,5 %	2259 ± 130 ^a
Xilitol 2,5%	2990 ± 130 ^a
Xilitol 5,0%	5330 ± 0 ^a

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=2 placas). Médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de ANOVA seguido de teste *post hoc* de Tukey (^a p<0,05).

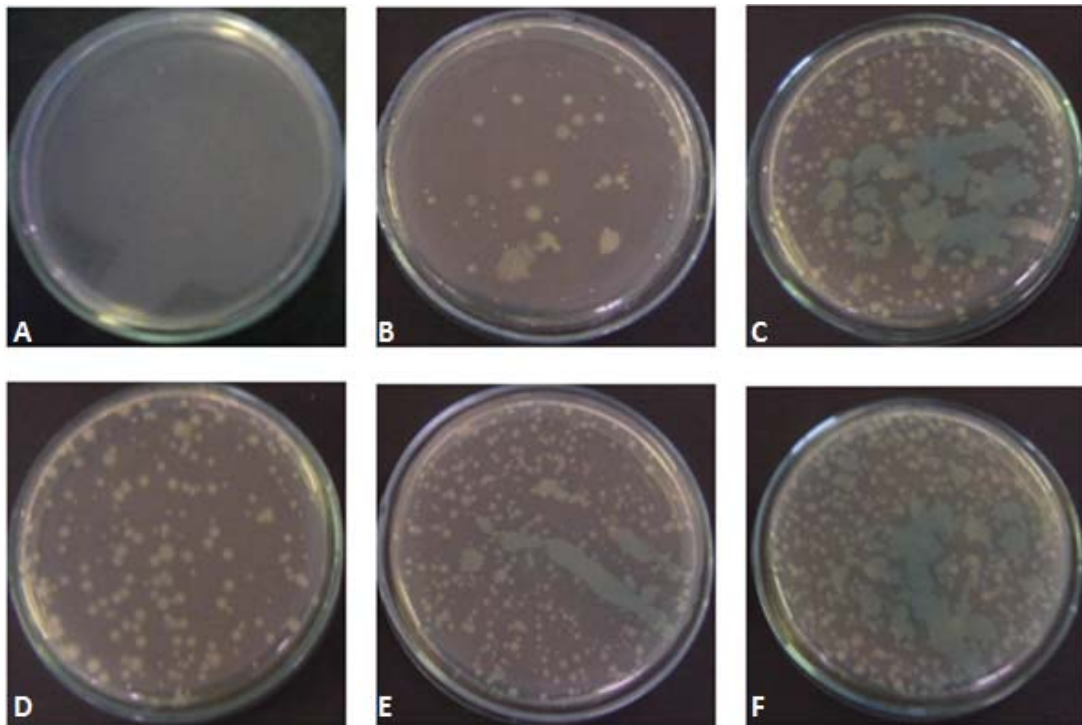


Figura 17 – Desprendimento de UFC's de *P. aeruginosa* ATCC 9027 pós-sonicação submetidas aos tratamentos experimentais: A) controle negativo, B) glicose 5,0%, C) manose 5,0%, D) xilitol 0,5%, E) xilitol 2,5%, F) xilitol 5,0%.

4.2.3 Aderência bacteriana - MEV

As microfotografias das lamínulas obtidas por MEV corroboram com os resultados de contagem das UFC's desprendidas, demonstrados anteriormente no item 4.2.2, para cada cepa.

4.2.3.1 *Escherichia coli* ATCC 8739

No experimento com *E.coli* ATCC 8739 não foram encontradas, no controle negativo, partículas com formas e/ou tamanhos semelhantes a células, indicando que o tratamento aplicado ao corpo de prova foi adequado (Figura 18 A). Foram observadas quantidades significativas de células tanto no controle positivo – glicose (Figura 18 B) quanto no controle positivo – manose (Figura 18 C), indicando que os bacilos de fato aderiram ao suporte (lamínula) utilizado na pesquisa. No entanto, nas amostras incubadas com xilitol 0,5% (Figura 18 D) e 5,0% (Figura 18 F) não foram observadas células, enquanto na amostra incubada com xilitol 2,5% (Figura 18 E) foram observados raros bacilos.

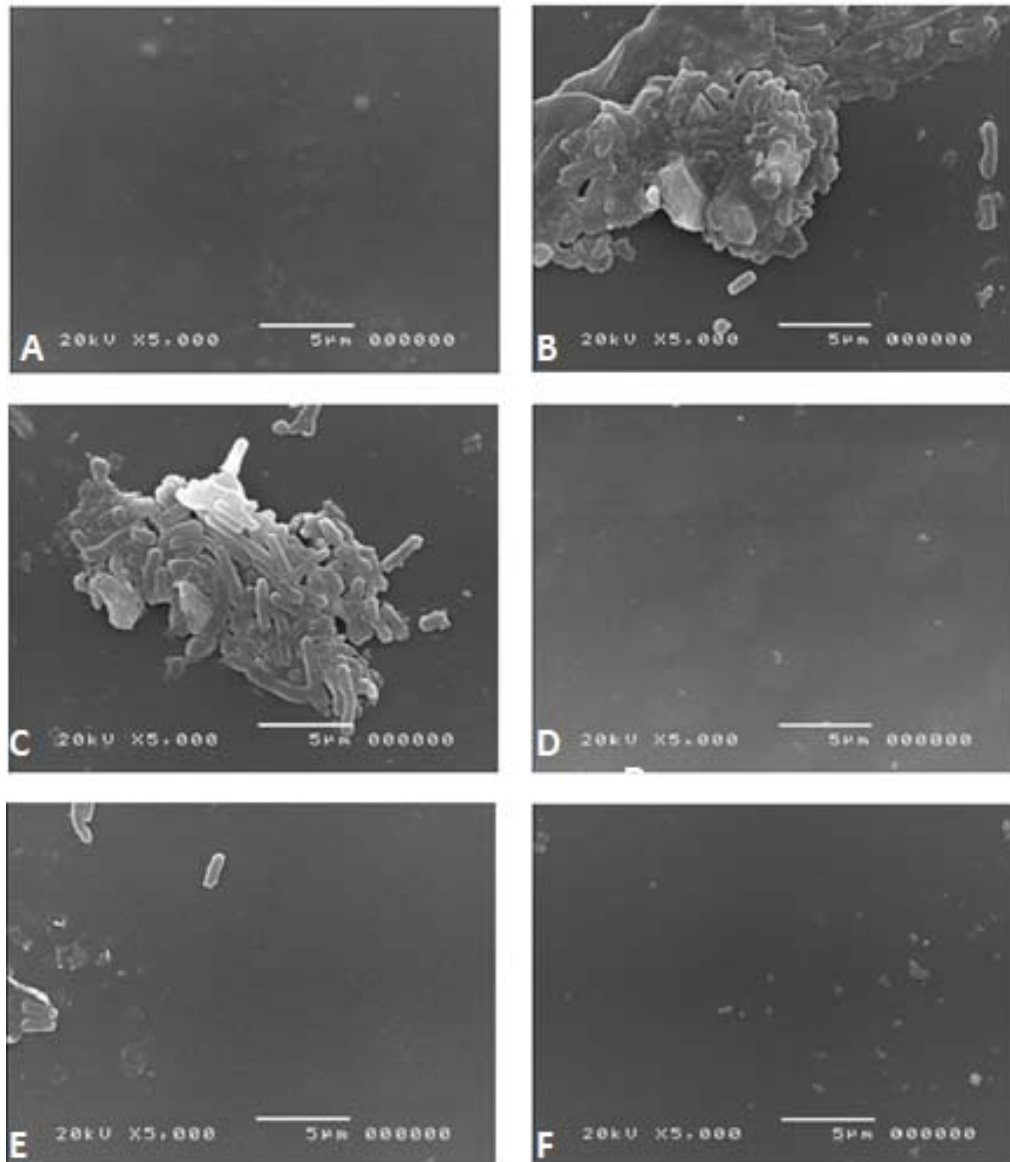


Figura 18 – Microfotografias de MEV da cepa *E.coli* ATCC 8739 nos tratamentos experimentais: A) controle negativo, B) glicose 5,0%, C) manose 5,0%, D) xilitol 0,5%, E) xilitol 2,5%, F) xilitol 5,0%.

4.2.3.2 *Escherichia coli* clínica (EPEC)

No experimento com *E.coli* clínica (EPEC) não foram encontradas, no controle negativo, partículas com formas e/ou tamanhos semelhantes a células (Figura 19 A). Foram observadas quantidades significativas de células apenas no controle positivo (glicose) (Figura 19 B), indicando que os bacilos de fato aderiram ao suporte, enquanto no controle positivo (manose) (Figura 19 C) não foram encontradas células. Já nas amostras incubadas com xilitol 0,5% (Figura 19 D),

xilitol 2,5% (Figura 19 E) e xilitol 5,0% (Figura 19 F), foram observados raros bacilos. Nas três concentrações do açúcar, foi observada uma redução expressiva do número de células aderidas em relação ao controle positivo (glicose).

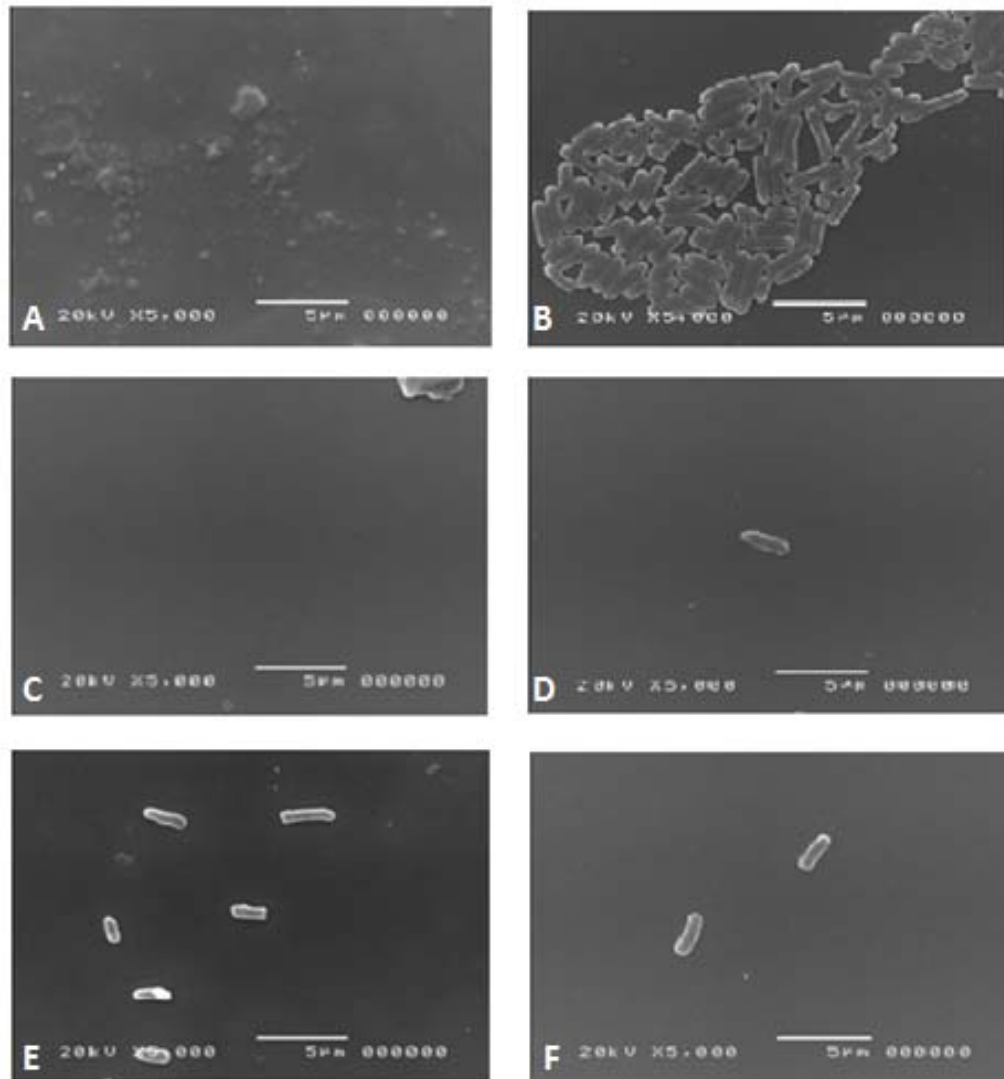


Figura 19 – Microfotografias de MEV da cepa *E.coli* clínica (EPEC) nos tratamentos experimentais: A) controle negativo, B) glicose 5,0%, C) manose 5,0%, D) xilitol 0,5%, E) xilitol 2,5%, F) xilitol 5,0%.

4.2.3.3 *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica

No experimento com *S. enterica* sorotipo Typhimurium clínica não foram encontradas, no controle negativo, partículas com formas e/ou tamanhos semelhantes a células (Figura 20 A). Foram observadas quantidades significativas de células tanto no controle positivo – glicose (Figura 20 B) quanto no controle positivo – manose (Figura 20 C) indicando que os bacilos de fato aderiram ao suporte (lamínula) utilizado na pesquisa. No entanto, nas amostras incubadas com xilitol 2,5% (Figura 20 E) não foram observadas células, enquanto nas amostras incubadas com xilitol 0,5% (Figura 20 D) e com xilitol 5,0% (Figura 20 F) foram observados raros bacilos.

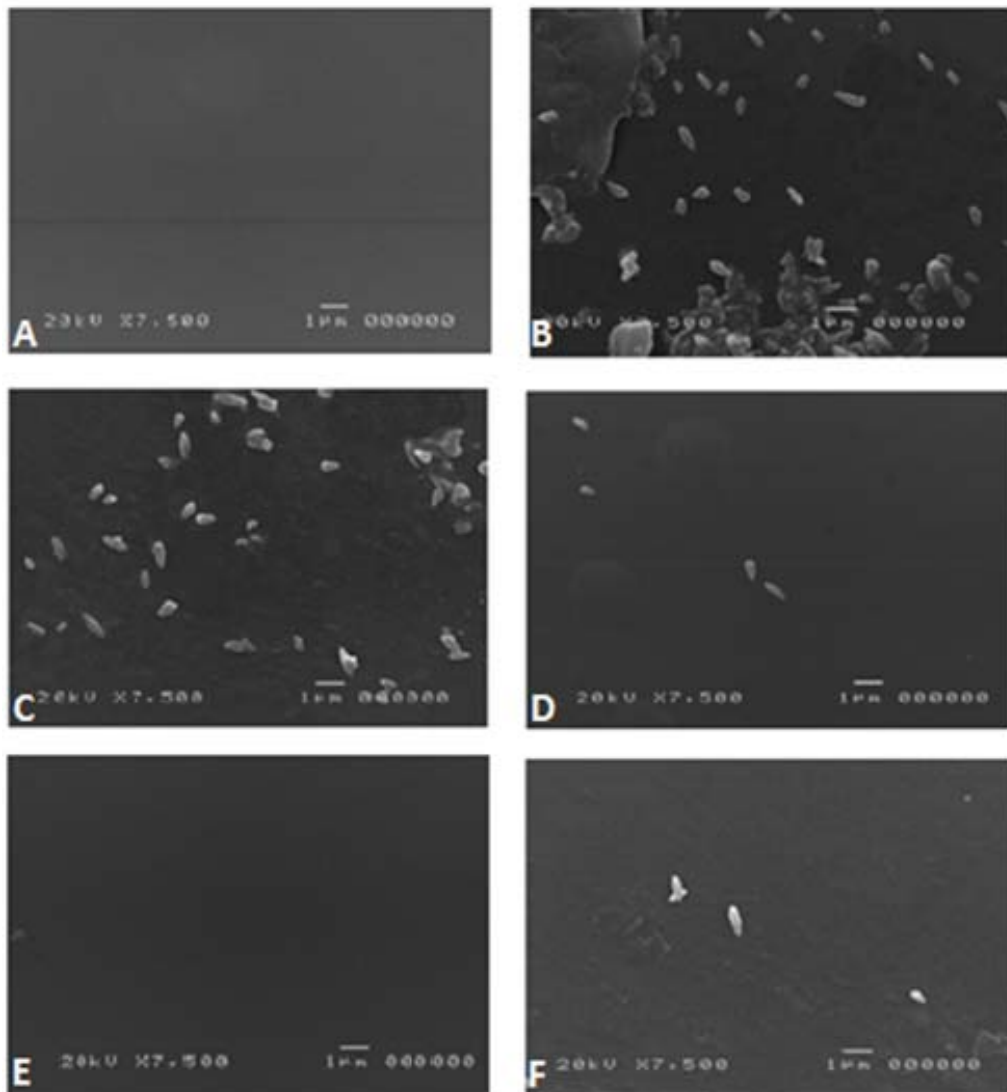


Figura 20 – Microfotografias de MEV da cepa *S. enterica* sorotipo Typhimurium clínica nos tratamentos experimentais: A) controle negativo, B) glicose 5,0%, C) manose 5,0%, D) xilitol 0,5%, E) xilitol 2,5%, F) xilitol 5,0%.

4.2.3.4 *Shigella flexneri* ATCC 12022

No experimento com *S. flexneri* ATCC 12022 não foram encontradas, no controle negativo, partículas com formas e/ou tamanhos semelhantes a células (Figura 21 A). Foram observadas quantidades significativas de células tanto no controle positivo – glicose (Figura 21 B) quanto no controle positivo – manose (Figura 21 C) indicando que os bacilos de fato aderiram ao suporte (lamínula) utilizado na pesquisa. No entanto, nas amostras incubadas com xilitol 0,5% (Figura 21 D), xilitol 2,5% (Figura 21 E) e xilitol 5,0% (Figura 21 F), foram observados raros bacilos.

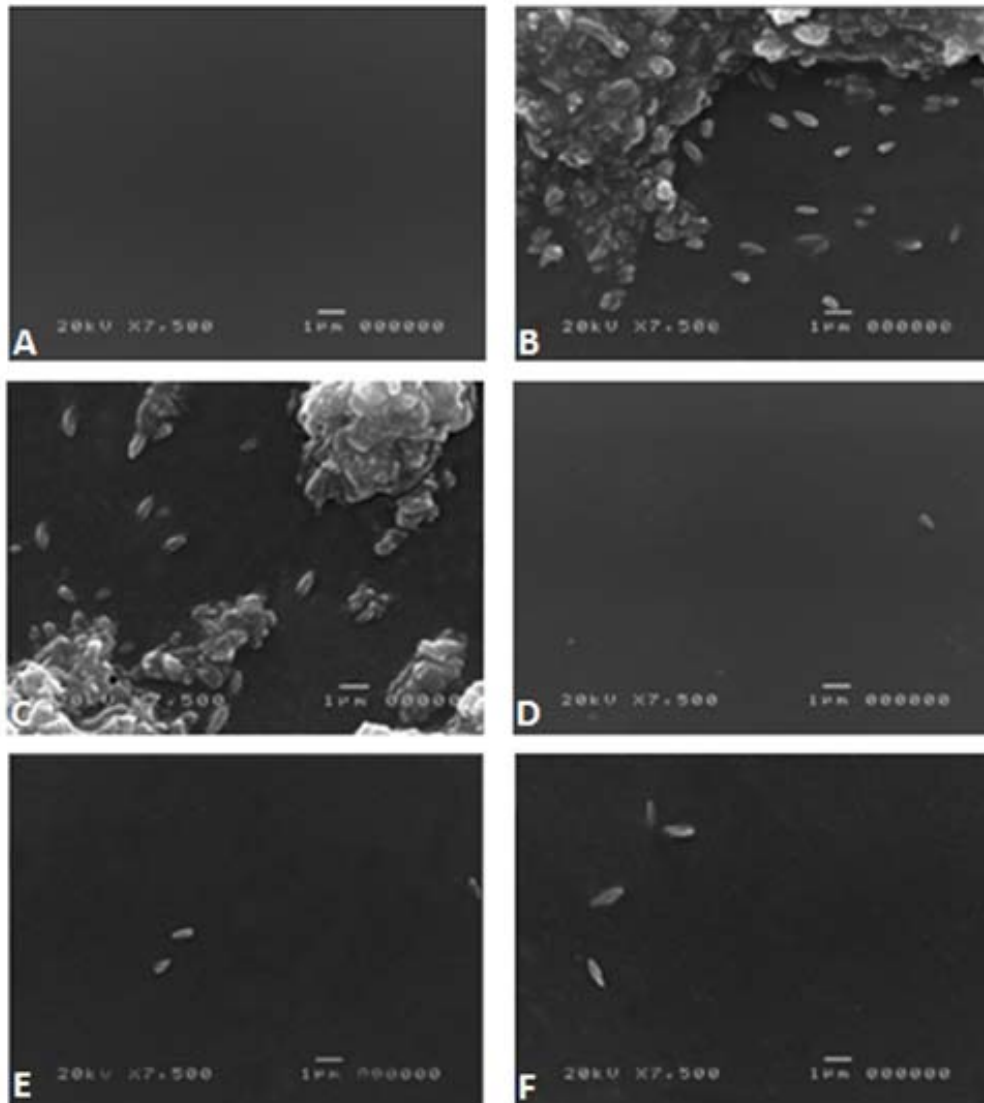


Figura 21 – Microfotografias de MEV da cepa *S. flexneri* ATCC 12022 nos tratamentos experimentais: A) controle negativo, B) glicose 5,0%, C) manose 5,0%, D) xilitol 0,5%, E) xilitol 2,5%, F) xilitol 5,0%.

4.2.3.5 *Shigella flexneri* clínica

No experimento com *S. flexneri* clínica não foram encontradas, no controle negativo, partículas com formas e/ou tamanhos semelhantes a células (Figura 22 A). Foram observadas quantidades significativas de células tanto no controle positivo – glicose (Figura 22 B) quanto no controle positivo – manose (Figura 22 C) indicando que os bacilos de fato aderiram à lamínula utilizada na pesquisa. Na amostra incubada com xilitol 0,5% (Figura 22 D), foram encontradas quantidades significativas de células tal como nos controles-positivo. Já nas amostras incubadas com xilitol 2,5% (Figura 22 E) e xilitol 5,0% (Figura 22 F) foram observados raros bacilos.

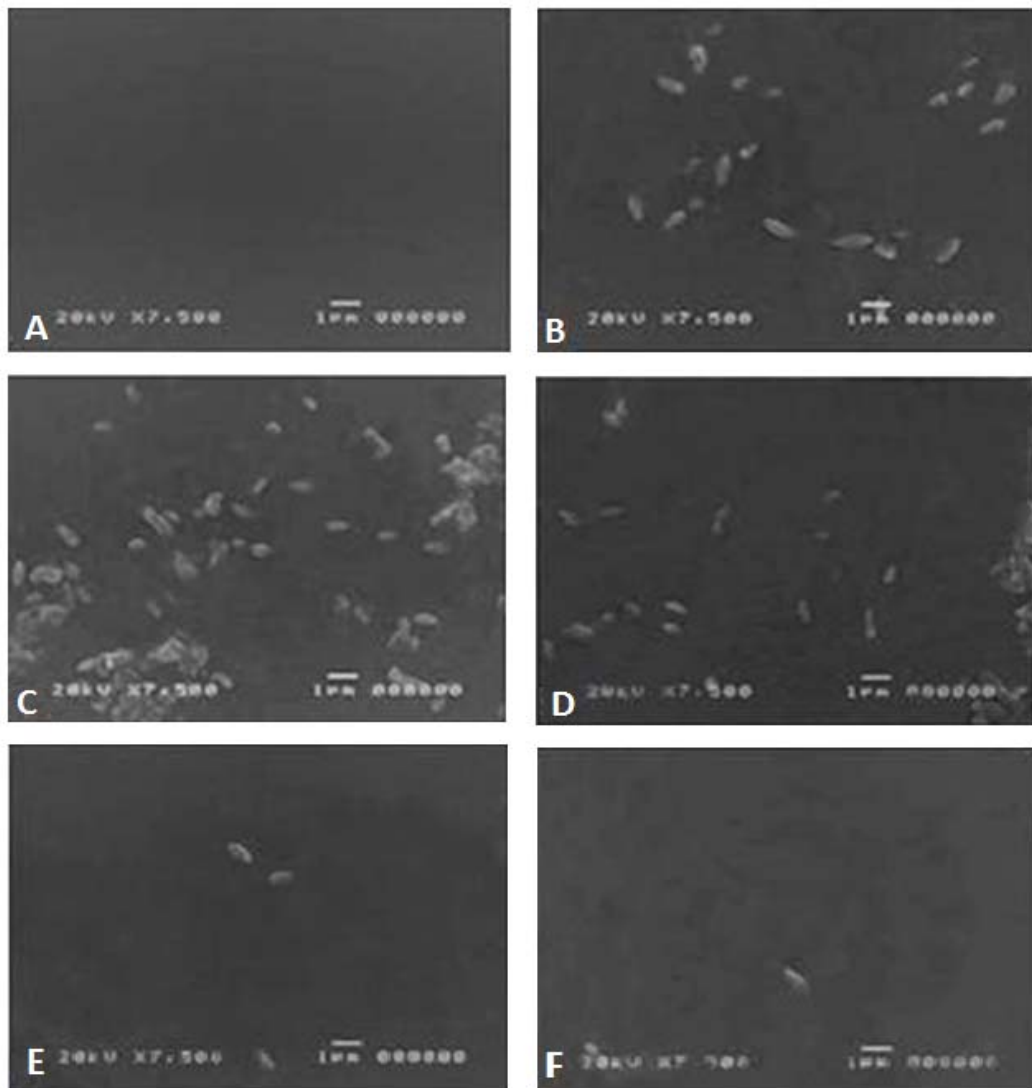


Figura 22 – Microfotografias de MEV da cepa *S. flexneri* clínica nos tratamentos experimentais: A) controle negativo, B) glicose 5,0%, C) manose 5,0%, D) xilitol 0,5%, E) xilitol 2,5%, F) xilitol 5,0%.

4.2.3.6 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

No experimento com *P. aeruginosa* ATCC 9027 não foram encontradas, no controle negativo, partículas com formas e/ou tamanhos semelhantes a células (Figura 23 A). Foram observadas quantidades significativas de células somente no controle positivo – glicose (Figura 23 B) indicando que os bacilos de fato aderiram ao suporte (lamínula) utilizado na pesquisa. No entanto, foram encontrados raros bacilos no controle positivo – manose (Figura 23 C). Nas amostras incubadas com xilitol 0,5% (Figura 23 D), xilitol 2,5% (Figura 23 E) e com xilitol 5,0% (Figura 23 F) não foram observadas células.

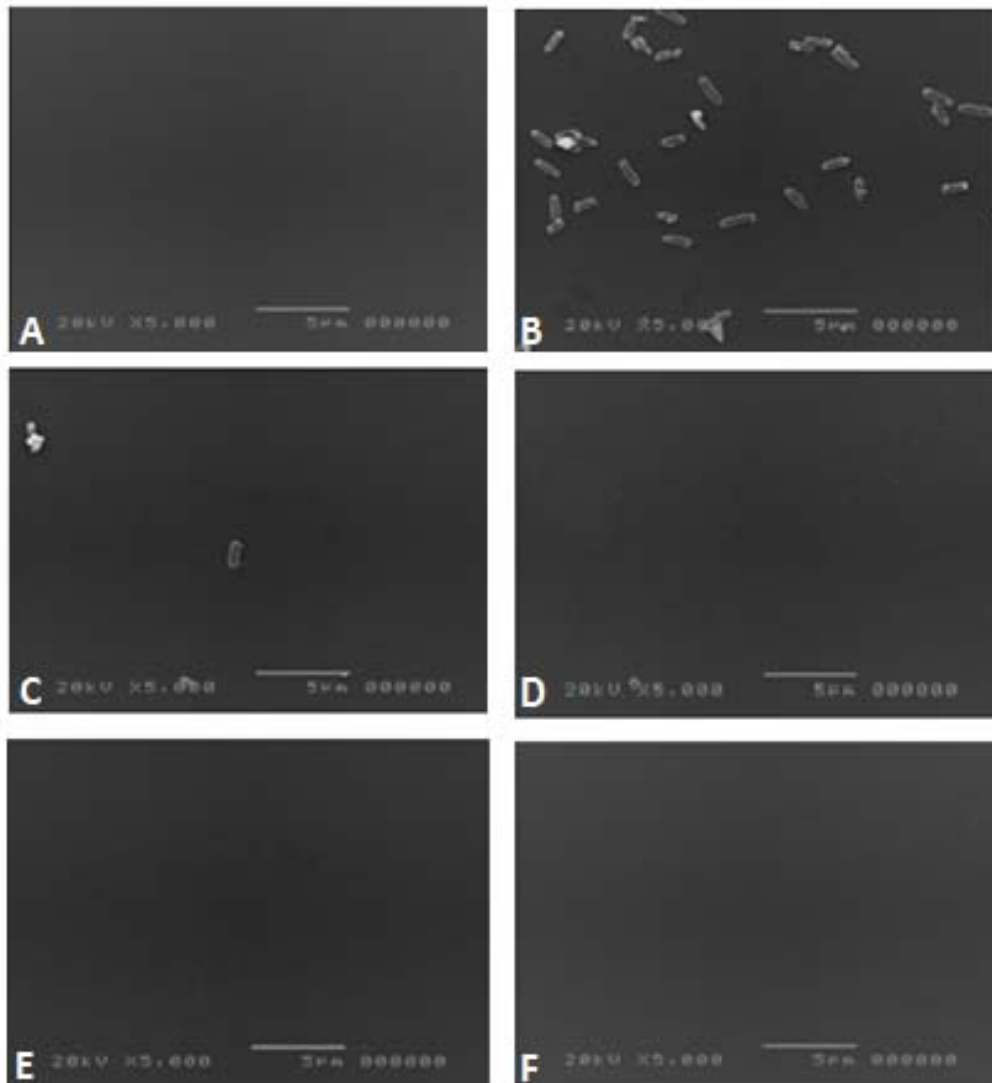


Figura 23 – Microfotografias de MEV da cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027 nos tratamentos experimentais: A) controle negativo, B) glicose 5,0%, C) manose 5,0%, D) xilitol 0,5%, E) xilitol 2,5%, F) xilitol 5,0%.

5 DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios de atividade antimicrobiana do xilitol foram realizados para avaliar a capacidade deste composto em inibir o crescimento das bactérias em estudo, e, caso fosse confirmada tal hipótese, para se determinar a CIM do xilitol para cada cepa. O método de turbidimetria foi utilizado já que a turvação do meio de cultura indica o crescimento do microrganismo. Para todas as cepas testadas, não se observou a inibição do crescimento bacteriano, indicando que o xilitol, nas três concentrações (0,5%; 2,5%, 5,0%), não possui atividade antimicrobiana sobre os microrganismos estudados.

A literatura reporta a ação antimicrobiana do xilitol sobre alguns microrganismos. Kontiokari, Uhari e Koskela (1995) observaram uma redução no crescimento de *Streptococcus pneumoniae* de 35% quando cultivada com 1% de xilitol por 2 h, e, de 72 % quando cultivada com 5% de xilitol por 2h. Zabner et al. (2000), ao estudarem a fibrose cística, constataram que o *spray* de xilitol (138 mM) utilizado por 4 dias em voluntários normais diminuiu significativamente o número de UFC's de *Staphylococcus coagulase negativa* quando comparado com solução salina. Além disso, este *spray* de xilitol aumenta a força iônica do meio sem interferir na osmolaridade e inibe o crescimento bacteriano, estimulando a ação de antimicrobianos naturais presentes na fina camada de superfície líquida das vias aéreas. Uhari, Tapiainen e Kontiokari (2001) consideraram o xilitol como uma atrativa alternativa para o tratamento da otite média aguda, pois este açúcar foi capaz de inibir o crescimento de *Streptococcus pneumoniae* e de *Haemophilus influenzae* nas células nasofaríngeas. Foi verificada, neste estudo, uma redução no número de crianças acometidas pela infecção de aproximadamente 40% quando o xilitol foi administrado via goma de mascar e de aproximadamente 30% quando administrado via xarope (8,4 – 10,0 g/dia, divididos em 5 doses). Contudo, o mecanismo de ação do xilitol nas bactérias otopatogênicas não pode ser justificado apenas pela inibição do crescimento bacteriano. Este carboidrato também possui

propriedades que diminuem a aderência de *Streptococcus pneumoniae* às células da nasofaringe, o que dificulta sua migração até a orelha média, importante etapa da patofisiologia da otite média aguda (PEREIRA et al., 2009).

Em relação ao controle da técnica, a turvação dos poços da microplaca contendo cloranfenicol ocorreu de maneira diferente entre os ensaios de cada linhagem. A cepa *Escherichia coli* clínica (EPEC) possui a CIM para cloranfenicol (250 µg/mL) superior ao da CIM para cloranfenicol (0,25 µg/mL) da cepa *Escherichia coli* ATCC 8739. Da mesma forma, a cepa *Shigella flexneri* clínica possui a CIM para cloranfenicol (250 µg/mL) superior ao da CIM para cloranfenicol (25 µg/mL) da cepa *Shigella flexneri* ATCC 12022. Estes fatos demonstram que cepas clínicas, isoladas de pacientes internados, possuem uma resistência maior ao cloranfenicol do que cepas ATCC, confirmando o maior potencial patogênico. O uso clínico indiscriminado de antimicrobianos exerce papel selecionador de cepas resistentes e, provavelmente, é a principal causa da resistência microbiana, sobretudo a observada no ambiente hospitalar, onde a pressão do uso destas drogas é maior. A cepa de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica possui a CIM para o cloranfenicol (25 µg/mL) inferior a das demais cepas clínicas visto que a sensibilidade ao cloranfenicol é característica das bactérias do gênero *Salmonella*, especialmente das cepas de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi. Devido a este fato, tal antimicrobiano tem sido utilizado como droga de escolha no tratamento de salmonelose sistêmica em humanos (ANTUNES et al., 2003; MAYRHOFER et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; PAES et al., 2009).

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes. O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico. Outro ponto a ser ressaltado é a utilização desse estudo como primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e surgimento de microrganismos patogênicos (OSTROSKY et al., 2008).

A resistência aos antimicrobianos pode ser natural, onde os genes da bactéria codificam enzimas que inativam o mecanismo de ação da droga; ou adquirida,

quando a bactéria torna-se resistente a um fármaco sensível, através da aquisição de fatores genéticos ou de mutações em seus genes de defesa (SILVA, 2008). A resistência a antimicrobianos nas bactérias dissemina-se em três níveis: 1) por transferência de bactérias entre pessoas; 2) por transferência de genes de resistência entre bactérias (geralmente por plasmídeos); e, 3) por transferência de genes de resistência entre elementos genéticos no interior das bactérias (transposons) (RANG et al., 2004).

A resistência às diferentes drogas antimicrobianas não é um fato inesperado, pois reflete o princípio evolutivo de que os organismos adaptam-se geneticamente a mudanças no seu meio ambiente (RANG et al., 2004). A compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência a antimicrobianos é importante tanto para o uso criterioso desses fármacos na prática clínica quanto para o desenvolvimento de novos agentes capazes de vencer a resistência (RANG et al., 2004). Dessa forma tem-se aumentado os esforços na busca por novas moléculas com atividade antimicrobiana. Muitas destas novas moléculas são originárias de extratos vegetais purificados (MITSCHER et al., 1987; SILVA, 2008).

No entanto, acredita-se também nos carboidratos, como futuros fármacos antiaderentes, podendo ser usados como adjuvantes no tratamento de doenças infecciosas (SHARON, 2006). Ainda neste contexto, a utilização do xilitol poderá representar uma alternativa bastante promissora, uma vez que este pode ser obtido por via biotecnológica, considerada de baixo custo, elevadas segurança e eficácia.

5.2 PROPRIEDADE ANTIADERENTE

Para todas as cepas testadas, a massa celular incontável formada nas placas dos tratamentos experimentais, confirma o resultado de todos os ensaios de atividade antimicrobiana realizados: o xilitol não foi capaz de impedir o crescimento bacteriano e, portanto, não possui ação antimicrobiana sobre nenhuma cepa estudada.

Em relação ao número de células desprendidas da lamínula, ou seja, a quantidade de bactérias que não aderiram ao corpo de prova, o esperado, no controle positivo (glicose) e no controle positivo (manose), seria um número de

UFC's pequeno, inferior ao número desprendido nas placas com xilitol, pois a maioria dos bacilos deveriam estar aderidos à lamínula. Contudo, para as cepas *E.coli* ATCC 8739, *E.coli* clínica (EPEC) e *S. enterica* sorotipo Typhimurium clínica, foi encontrado, nos controles-positivo, um número de UFC's desprendidos superior ao observado pelos tratamentos com xilitol. Uma possível explicação para estes resultados seria o suporte de glicose e manose no meio de cultura, que, possivelmente, leva ao aumento da disponibilidade de nutrientes e da multiplicação bacteriana, resultando em um expressivo número de células tanto aderidas à lamínula quanto desprendidas durante a sonicação. Furlan e Castro (2001) e Silva et al. (2007) concluíram, em seus estudos, que a presença de glicose no meio de cultura aumenta especificamente a taxa de crescimento microbiano. Para as três cepas, a contagem do controle positivo (manose) foi inferior ao do controle positivo (glicose), uma vez que a glicose é o primeiro açúcar de escolha para o metabolismo bacteriano. Para as demais cepas, *S. flexneri* ATCC 12022, *S. flexneri* clínica e *P. aeruginosa* ATCC 9027, ocorreu conforme esperado: ambos os controles-positivos liberaram um número de UFC's inferior ao número desprendido pelas diferentes concentrações de xilitol. O suporte nutricional não afetou a taxa de crescimento destas cepas, uma vez que as bactérias do gênero *Shigella* são relativamente inertes e de crescimento lento, enquanto a *P. aeruginosa* é um bacilo não fermentador de glicose (não utiliza este açúcar para seu crescimento).

A glicose é um açúcar ideal para ser utilizado como controle positivo de ensaios de aderência bacteriana. Vanmaele e Armstronga (1997) afirmaram que a adesão localizada (LA) é um fenótipo induzido por condições específicas do crescimento bacteriano. Tipos selvagens de EPEC, ligadas a células HEp-2, apresentaram um padrão de LA satisfatório quando estas linhagens foram cultivadas em meio contendo glicose, enquanto cepas EPEC, incubadas em meio contendo outro açúcar como fonte de carbono (por exemplo, galactose), não aderiram às células HEp-2. A expressão do fenótipo de aderência por parte de organismos cultivados em glicose estava associada ao aumento da expressão do pili BFP (VANMAELE E ARMSTRONGA, 1997).

Analisando o número de UFC's desprendidas pelo xilitol para as cepas *E.coli* ATCC 8739, *E.coli* clínica (EPEC) e *P. aeruginosa* ATCC 9027, pode-se observar uma elevada correlação positiva entre as três concentrações do açúcar e o desprendimento bacteriano, o que caracteriza a relação de dose-dependência do

xilitol. Para ambas as cepas de *S. flexneri* (ATCC 12022 e clínica), a relação de dose-dependência não foi observada, uma vez que a correlação entre as concentrações do açúcar e o desprendimento bacteriano foi negativa. Para a cepa *S. enterica* sorotipo Typhimurium clínica, foi observado que, para as três concentrações de xilitol, o número de bacilos não aderidos foi estatisticamente igual, o que significa que, para tal cepa, a propriedade antiaderente deste composto independe de sua concentração.

A interação do xilitol com a bactéria *Escherichia coli* é baseada no fato dos pentitóis interferirem no metabolismo dos açúcares de seis carbonos. Tal interferência é conhecida como “toxicidade do xilitol”, mas esta expressão se limita apenas aos microrganismos, sendo que o xilitol não apresenta toxicidade para humanos. Dessa forma, os pentitóis podem alterar o metabolismo bacteriano das hexoses e, isso explica o papel que o xilitol possui na prevenção de algumas doenças infecciosas (MAKINEM, 2000).

Dessa forma, para se obter uma melhor conclusão sobre a capacidade do xilitol em inibir a aderência bacteriana, foi necessária uma análise qualitativa fornecida pelas microfotografias obtidas por MEV. Para todas as cepas testadas, foi observada uma redução expressiva da aderência microbiana, nas três concentrações de xilitol, em relação ao controle positivo (glicose) e ao controle positivo (manose), reforçando a idéia de antiaderência do composto estudado. A cepa *S. flexneri* clínica representou uma exceção, pois a redução da aderência só foi observada nas concentrações de 2,5% e 5,0% de xilitol, sendo encontradas expressivas quantidades de células na menor concentração do açúcar (para esta cepa 0,5% de xilitol não foi suficiente para inibir a aderência).

Curiosamente, não foram encontradas células nas microfotografias do controle positivo (manose) para as cepas de *E.coli* clínica (EPEC) e *P. aeruginosa* ATCC 9027, indicando que, para estas linhagens bacterianas, a manose também é um açúcar inibidor da aderência.

Este fato já era esperado para a cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027, uma vez que tal espécie não pertence à família *Enterobacteriaceae*, na qual, a aderência mediada por manose é normalmente encontrada. A *P. aeruginosa* é uma bactéria comumente associada às infecções das vias aéreas, e, para a colonização ocorrer, é necessário um contato prolongado da bactéria com a mucosa respiratória. Este evento pode ser favorecido quando o epitélio mucociliar é danificado, como, por

exemplo, pelo hábito de fumar. É sabido que o fumo diminui a frequência do batimento ciliar, provoca um aumento da produção de muco e leva ao aumento do número de cílios anormais, contribuindo para o dano deste epitélio. A combinação destes fatores leva à persistência de microorganismos nas vias aéreas, aumentando o risco de colonização, e, conseqüentemente, de infecções das vias respiratórias (PIATTI, GAZZOLA e ALLEGRA, 1997).

Uma possível explicação para os resultados obtidos com a *E.coli* clínica (EPEC) seria baseada no fato desta cepa possuir fímbrias tipo 1 ou manose-sensíveis, cuja aglutinação com eritrócitos é inibida pela D-manose (BRITO et al., 2004; TOMA et al., 2008). Assim, quando a manose estava presente no meio, a aderência da bactéria ao corpo de prova foi impedida. As fímbrias bacterianas reconhecem alguns carboidratos solúveis e levam ao bloqueio *in vitro* da aderência dessas bactérias (SHARON e OFEK, 2000; SHARON, 2006). A presença da fímbria tipo 1 é comum na família *Enterobacteriaceae* e em amostras de *E. coli* patogênicas de origem fecal e urinária (BRITO et al., 2004; TOMA et al., 2008).

A aderência bacteriana tem sido bastante estudada tanto em ensaios com culturas de células (NAABER et al., 1996; SUBRAMANIAN et al., 2008; TOMA et al., 2008) quanto em ensaios *in vitro*, (LOCATELLI et al., 2004; GUS et al., 2006; FERREIRA, 2007) onde a microscopia eletrônica se destaca por ser mais indicada para avaliar a interação microbiana com uma determinada superfície (MACEDO, 2000). Em especial, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma importante ferramenta para se observar a morfologia da bactéria e sua aderência às superfícies materiais, como, por exemplo, lamínulas de vidro (FERREIRA, 2007; FERREIRA et al., 2009) Além da microscopia por diferentes métodos, para avaliar quantitativamente e morfologicamente a bactéria em estudo, pode-se utilizar também a contagem de bactérias viáveis como método indireto de se avaliar a aderência (AN e FRIEDMAN, 1997), conforme foi realizado neste estudo.

Os efeitos de diversos compostos sobre a aderência de microorganismos são recentes e há poucos trabalhos descritos na literatura científica abordando essa aplicação (SHARON e OFEK, 2000). A observação em conjunto dos resultados obtidos neste estudo, tanto das microfotografias obtidas pela microscopia quanto da contagem das UFC's desprendidas, para cada cepa, indicam que o mecanismo de ação do xilitol está baseado no impedimento da aderência bacteriana.

A maioria das doenças infecciosas é iniciada pela aderência de

microrganismos patogênicos no tecido do hospedeiro. Em muitos casos, esta aderência é mediada por fímbrias ou pili, que estão presentes na superfície do patógeno e se ligam a hidratos de carbono na superfície do tecido hospedeiro. Alguns carboidratos solúveis são reconhecidos pela lecitina bacteriana e levam ao bloqueio *in vitro* da aderência das bactérias em células animais (SHARON e OFEK, 2000; SHARON, 2006).

O futuro da terapia antiaderente depende de um melhor conhecimento das propriedades e especificidades de adesinas bacterianas e do desenvolvimento de agentes apropriados que bloqueiem a aderência de diversas bactérias. Alguns agentes da terapia antiaderente incluem os receptores de adesinas e seus análogos, e, constituintes da própria dieta como, por exemplo, a combinação de potentes carboidratos. Pelo fato desse mecanismo de combate a infecções não ser bactericida, a probabilidade da disseminação de cepas multirresistentes é bem menor quando comparada à exposição a antimicrobianos. Uma vez que tais agentes estiverem disponíveis, estes poderão se tornar a droga de escolha para o combate de uma série de doenças infecciosas (OFEK, HASTY e SHARON, 2003).

Alguns trabalhos na literatura reforçam a idéia da propriedade antiaderente do xilitol. Naaber et al. (1996) constataram uma inibição dose-dependente da aderência de *Clostridium difficile* em células Caco-2, quando se utilizou xilitol nas concentrações 1,0%, 5,0%, 10,0% (p/v). Os autores desconhecem o mecanismo de ação envolvido mas sugerem que o mesmo possa ocorrer *in vivo*, nas células intestinais. Kontiokari, Uhari e Koskela (1998) avaliaram a aderência de microrganismos na presença de 5% de xilitol, o qual impediu a aderência da bactéria *Streptococcus pneumoniae*, e, em menor proporção, a de *Haemophilus influenzae*. Sajjan et al. (2004) observaram que o xilitol inibiu 67-85% a aderência de *Burkholderia cepacia*. Tapiainen et al. (2004) observaram mudanças na cápsula e na parede celular de *Streptococcus pneumoniae*, após exposição ao xilitol (0,5% – 5,0% por 2 h). A parede celular desta bactéria tornou-se mais difusa e a cápsula de polissacarídeo tornou-se mais áspera. O fenótipo de todas as cepas testadas, antes da exposição ao açúcar, era opaco e tornou-se quase transparente durante o experimento. Foi sugerido que a capacidade do xilitol em alterar a estrutura das bactérias é responsável pela inibição da aderência e, conseqüentemente, pela mudança da virulência de microrganismos. Ferreira (2007) fez um estudo com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e obteve resultados similares, constatando que

o açúcar não possui propriedades bacteriostáticas ou bactericidas, mas sim, atua inibindo a aderência da bactéria a uma superfície, sendo esse o provável mecanismo de ação do xilitol.

As infecções hospitalares podem envolver microrganismos multirresistentes a diversos fármacos e, por isso, deve-se evitar, o quanto for possível, a administração de antimicrobianos. Os resultados encontrados nesta pesquisa e também em alguns trabalhos da literatura conferem ao xilitol um maior valor agregado, pois reforça a sua capacidade de inibir a aderência de diferentes microrganismos. Dessa forma, tal composto poderia ser adequado para ser utilizado em materiais médicos e hospitalares, no intuito de se impedir/atenuar a formação de biofilmes microbianos responsáveis pela maioria das infecções hospitalares. A formação de biofilmes sobre uma superfície representa uma estratégia bacteriana para sobrevivência e favorecimento em relação aos nutrientes disponíveis. A ocorrência e a taxa de proliferação dependem da virulência microbiana, fatores do hospedeiro e características do material (materiais para sutura, diferentes cateteres e sondas, válvulas cardíacas e outros) como, por exemplo, a rugosidade. O processo de aderência bacteriana à superfície de biomateriais é extremamente complicado e afetado por muitos fatores, incluindo fatores ambientais, presença de proteínas séricas, tratamentos com antimicrobianos, e propriedades dos microrganismos e da superfície do material (KATSIKOIANNI e MISSIRLIS, 2004).

As bactérias do biofilme são protegidas da resposta imune do hospedeiro e da terapia antimicrobiana e, desta forma, a infecção raramente é resolvida de forma rápida ou eficaz. Relatos clínicos demonstram claramente que a presença de um biomaterial torna os tecidos adjacentes sensíveis tanto à infecção imediata quanto à tardia. Uma infecção causada por um biomaterial contaminado responde mal à antibioticoterapia, e, normalmente não se cura até que o material seja removido. Um entendimento da natureza das complicações influenciadas por um corpo estranho, ou por tecido comprometido por este, se torna essencial uma vez que se tem observado um aumento do uso de biomateriais (GRISTINA e COSTERTON, 1985).

O estudo de substâncias de origem biotecnológica com características antiaderentes tem como finalidade atenuar a aderência de microrganismos na superfície celular e na superfície de materiais médicos e hospitalares, impedindo a formação do biofilme microbiano, fonte constante de infecções. Nesse contexto, o xilitol pode tornar-se o adjuvante de escolha no tratamento de uma série de

doenças infecciosas, uma vez que os carboidratos estão, cada vez mais, relacionados com o futuro da terapia antiaderente.

Considerando a nova abordagem que este estudo representa, os resultados encontrados nos levam a apontar perspectivas para trabalhos futuros como, por exemplo, estudos *in-vivo* de avaliação da propriedade antiaderente do xilitol; estudos da aderência bacteriana a nível celular como forma de se elucidar, de forma mais minuciosa, o mecanismo que impede a aderência de microrganismos; estudos da microestrutura de biomateriais susceptíveis à contaminação, visando a obtenção de um revestimento com características antiaderentes, que impeça a formação do foco de infecção; e, finalmente, estudos para se buscar novas moléculas e determinar análogos eficazes que possam impedir a aderência microbiana inicial.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- O xilitol, nas concentrações testadas: 0,5%; 2,5% e 5,0% (p/v), não possui atividade antimicrobiana sobre as cepas *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* clínica (EPEC), *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Shigella flexneri* clínica e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
- O xilitol, nas concentrações testadas: 0,5%; 2,5% e 5,0% (p/v), é capaz de inibir, *in vitro*, a aderência das cepas supra-citadas, limitando assim, a formação do biofilme bacteriano.
- A capacidade de inibir a aderência de diferentes microrganismos confere ao xilitol maior valor agregado. Neste contexto, o xilitol torna-se uma biomolécula adequada para ser usada como adjuvante terapêutico, para a prevenção e/ou tratamento de infecções recorrentes e para impedir a formação de biofilmes em materiais médicos-hospitalares.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C.L.; OETTERER, M.; MENEZES, T.J.B. 1999. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. **Boletim da SBCTA**, **33**: 184-193.

ALTERTHUM F.; TRABULSI, L.R. 2003. **Microbiologia**. São Paulo: Ed. Atheneu. 720p.

ALTERTHUM F. 2004. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p.79.

AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. 1998. The influence of xylitol and fluoride on dental erosion *in-vitro*. **Archives of Oral Biology**, **43**: 157-161.

AMMONS, M.C.B.; WARD, L.S.; FISHER, S.T.; WOLCOTT, R.D.; JAMES, G.A. 2009. In vitro susceptibility of established biofilms composed of a clinical wound isolated of *Pseudomonas aeruginosa* treated with lactoferrin and xylitol. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **33**: 230-236.

AN, Y.H.; FRIEDMAN, R.J. 1997. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. **Journal of Microbiological Methods**, **30**: 141-152.

ANTUNES, P.; RÉU, C.; SOUSA, J.C.; PEIXE, L.; PESTANA, N. 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents, **International Journal of Food Microbiology**, **82**: 97-103.

ARAUJO, L.M. 2007. **Produção de alimentos funcionais formulados com xilitol a partir de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**. Tese (Curso Multiinstitucional de Doutorado em Biotecnologia – Tecnologia de Frutos Tropicais). Universidade Federal do Amazonas, Manaus - AM, 155f.

BALAN, A.P.R.T. 2007. **Epidemiologia molecular de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metallo- β -Lactmases isoladas de pacientes no Hospital São Paulo em 2004**. Dissertação (Mestrado – Ciências Básicas em Doenças Infecciosas). Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo - SP, 64f.

BAR, A. 1991. Xylitol. In: O' BREEN NABOURS, L.; GELARDI, R.C. **Alternative Sweeteners**. New York: Marcel Deckker, 349-373.

BASOTHERM GMBH. Franz Helmut; Kompa Hannes E.; Rozman Tibor. 1994. **Pharmaceutical composition for topical application to the eye for treating increased intraocular pressure**. CA2105530, 05 mar.

BRASIL. 2005. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o “regulamento técnico que aprova o uso dos aditivos alimentares, coadjuvantes de tecnologia, estabelecendo suas funções e limites, e veículos para suplementos vitamínicos e ou minerais”. **RDC nº 24, de 15 de fevereiro de 2005**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 30 jul. 2009.

BRITO, B.G.; VIDOTTO, M.C.; BERBEL, M.M.; TAGLIARI, K.C. 2004. Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. **Ciência Rural**, **34**: 645-652.

CANDAN, F.; UNLU M.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, A.; AKPULAT, A. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, **87**: 215-220.

ELLOF, J.N.A. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extract for bacteria. **Planta Medica**, **64**: 711-13.

EUZÉBY, J.P. 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **47**: 590-592.

FERREIRA, A.S. 2007. **Estudo de propriedades microbiológicas e toxicológicas do xilitol visando a sua aplicação no controle da dermatite atópica**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena - SP, 117f.

FERREIRA, A.S.; BARBOSA, N.R.; JÚNIOR, D.R.; SILVA, S.S. 2009. *In vitro* mechanism of xylitol action against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. In: **Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Ed. Mendez-Vilas, A. Seville: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, p. 505-509.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. 2005. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed. Ateneu.

FRANZ, H.; KOMPA, E.; ROZMAN, T. 1996. **Pharmaceutical composition for topical application to the eye for treating increased intraocular pressure**. USP 5.527.831, 18 jun.

FREIRE, M.C.M.; CANNON, G.; SHEIHAM, A. 1994. Análise das recomendações internacionais sobre o consumo de açúcares publicadas entre 1961 e 1991. **Revista de Saúde Pública**, **28**.

FURLAN, S.A.; CASTRO, H.F. 2001. Xylitol production by *Candida parapsilosis* under fed-batch culture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, **44**: 125-128.

GEORGIEFF, M.; OEHMKE, M. 1990. **Hypocaloric low osmotic aqueous preparation for infusion**. EP 0150053B1, 13 jun.

GEORGIEFF, M.; PSCHIEDL, E.; MOLDAWER, L.L.; BISTRAN, B.R.; BLACKBURN, G.L. 1991. Mechanisms of protein conservation during xylitol infusion after burn injury in rats: isotope kinetics and indirect calorimetry. **European Journal of Clinical Investigation**, **21**: 249-258.

GIRÓN, J.A.; HO, A.S.Y.; SCHOOLNIK, G.K. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, **254**: 710-713.

GRISI, S.J.F.E.; EJZENBERG, B.; NETO, E.R.; KIMURA, H.; NETO, L.B.; HORITA, S.; BALDACCI, E.R. 1983. Bacteremia por *Salmonella typhimurium* e acometimento pulmonar. **Pediatria (São Paulo)**, **5**: 313-316.

GRISTINA, A.G. e COSTERTON, J.W. 1985. Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, **67A**: 264-273.

GUS, P.I.; MELAMED, J.; BARTH, A.; SUDHAUS, B.D.; QUINTO, G.; MATOS, G.H. 2006. Aderência *in vitro* do *Staphylococcus epidermidis* e da *Pseudomonas alcaligenes* em lentes intra-oculares. **Arquivos Brasileiros de Oftamologia**, **69**: 327-331.

IWATA, C.; NAKAGAKI, H.; MORITA, I.; SEKIYA, T.; GOSHIMA, M.; ABE, T.; ISOGAI, A.; HANAKI, M.; KUWAHARA, M.; TATEMATSU, M.; ROBINSON, C. 2003. Daily use of dentrifice with and without xylitol and fluoride: effect on glucose retention in humans *in vivo*. **Archives of Oral Biology**, **48**: 389-395.

JANKOWSKA, A.; LAUBITZ, D.; ANTUSHEVICH, H.; ZABIELSKI, R.; GRZESIUK, E. 2008. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, **2008**: 6 pages.

JÚNIOR, E.G.J.; LANDUCCI, L.F.; CAMPOS, M.J.A. 2002. Hydrophobicity and adherence of *Fusobacterium nucleatum* isolated from human and *Cebus apella* monkeys to oral epithelial cells. **Ciência Odontológica Brasileira**, **5**: 13-17.

KATSIKOIANNI, M. e MISSIRLIS, Y.F. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria material interactions. **European Cells and Materials**, **8**: 37-57.

KONTIOKARI, T.; SVANVERG, M.; MATTILA, P.; LEINONEN, M.; UHARI, M. 1999. Quantitative analysis of the effect of xylitol on pneumococcal nasal colonisation in rats. **FEMS Microbiology Letters**, **178**: 313-317.

KONTIOKARI, T.; UHARI, M.; KOSKELA, M. 1995. Effect of xylitol on growth of nasopharyngeal bacteria *in vitro*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **39**: 1820-1823.

KONTIOKARI, T.; UHARI, M.; KOSKELA, M. 1998. Antiadhesive effects of xylitol on otopathogenic bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **41**: 563-565.

KRUGER, C. 2005. Efeitos refrescantes com xilitol. **Aditivos & Ingredientes**, **36**: 26-27.

LEE, J.; SHIM, J.S.; LEE, J.S.; KIM, M.; CHUNG, M.; KIM, K.H. 2006. Pectin-like acidic polysaccharide from *Panax ginseng* with selective antiadhesive activity against pathogenic bacteria. **Carbohydrate Research**, **341**: 1154-1163.

LIBERATORE, A.M.A.; TOMITA, S.K.; VIEIRA M.A.M.; JÚNIOR, C.T.; HECKMAIER J.; GOMES T.A.T. 2007. Expression of aggregative adherence to hela cells by *Escherichia coli* strains isolated from sick horses. **Brazilian Journal Microbiology**, **38**: 9-13.

LIMA, L.H.A.; BERLINCK, C.N. 2003. Xilitol, o adoçante do futuro. **Ciência Hoje**, **33**: 66-69.

LOCATELLI, C.I.; ENGLERT, G.E.; KWITKO, S.; SIMONETTI, A.B. 2004. Aderência bacteriana *in vitro* a lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, **67**: 241-248.

LORENZONI, M.M. 2009. **Caracterização de prováveis genes do sistema de secreção tipo III em *Escherichia coli* de adesão difusa.** Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular). Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília - DF, 97f.

MACEDO, J.A.B. 2000. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica. **Revista Fármacos & Medicamentos, 2:** 19-24.

MAKINEN, K.K. 2000. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? **Medical Hypotheses, 54:** 603-613.

MANZ, U.; VANNINEN, E.; VOIROL, F. 1973. Xylitol - it's properties and use as a sugar substitute in foods. In: **F.R.A. SYMPOSIUM ON SUGAR AND SUGAR REPLACEMENTS**, London, 10 out.

MASAKO, K.; HIDEYUKI, I.; SHIGEYUKI, O.; ZENRO, 2005a. I. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. **Journal of Dermatological Science, 38:** 197-205.

MASAKO, K.; YUSUKE, K.; HIDEYUKI, I.; ATSUKO, M.; YOSHIKI M.; KAYOKO, M.; MAKOTO, K. 2005b. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 2. A study to assess the effect of a cream containing farnesol and Xylitol on atopic dry skin. **Journal of Dermatological Science, 38:** 207-213.

MATTILA, P.T.; KNUUTTILA, M.L.E.; SVANBERG, M.J. 1998. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin - diabetic rats. **Metabolism: clinical and experimental, 47:** 578-583.

MATTILA, P.T.; SVANBERG, M.J.; PÖKKÄ, P.; KNUUTTILA, M.L.E. 1998. Dietary xylitol protects against weakening of bone biomechanical properties in ovariectomized rats. **The Journal of Nutrition, 128:** 1811-1814.

MATTILA, P.T.; KNUUTTILA, M.; KOVANEN, V.; SVANBERG, M. 1999. Improved bone biomechanical properties in rats after oral Xylitol administration. **Calcified Tissue International, 64:** 340-344.

MAYRHOFER, S.; PAULSEN, P.; SMULDERS, F.J.M.; HILBERT, F.; 2004. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry, **International Journal of Food Microbiology, 97:** 23-29.

MAYERHOFF, Z.D.V.L.; ROBERTO, I.C.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M. 1996. Seleção de leveduras para produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES. **Anais São Carlos: U FSC, 2: 550-555.**

McEWAN, N.A.; RÉME, C.A.; GATTO, H.; NUTTALL, T.J. 2008. Monosaccharide inhibition of adherence by *Pseudomonas aeruginosa* to canine corneocytes. **Veterinary Dermatology, 19: 221-225.**

MITSCHER, L.A.; DRAKE, S.; GOLLOPUDI, S.R.; OKWUTE, S.K. 1987. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. **Journal of Natural Products, 50: 1025-1040.**

MORAES, H.P. 2006. **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos de *Byrsonima* spp. e *Alchornea* spp.: Estudo comparativo entre as técnicas de diluição em tubos e microplacas.** Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”(UNESP), Araraquara - SP, 96f.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. 2002. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 38: 401-413.**

NAABER, P.; LETHO, E.; SALMINEN, S.; MIKELSAAR, M. 1996. Inhibition of adhesion of *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology, 14: 205-209.**

NATARO, J.; KAPER, J. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews, 11: 142-201.**

NIGAM, P.; SINGH, D. 1995. Processes for fermentative production of xylitol – a sugar substitute. **Process Biochemistry, 30: 117-124.**

NOWAKONSKI, A.V. 2007. **Vigilância laboratorial de bacteremias por microrganismos Gram negativos em pacientes adultos internados no Hospital das Clínicas – UNICAMP no período de 2000-2004: Implicação do uso de antimicrobianos selecionados no perfil de resistência destes microrganismos.** Dissertação (Mestrado - Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas) Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 70f.

OFEK, I.; HASTY, D.; SHARON, N. 2003. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **38**: 181-191.

OFEK, I.; KAHANE, I.; SHARON, N. 1996. Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases. **Trends in Microbiology**, **4**: 297-299.

OLIVEIRA, S.D.; FLORES, F.S.; SANTOS, L.R.; BRANDELL, A. 2005. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples, **International Journal of Food Microbiology**, **97**: 297-305.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M. NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **18**: 301-307.

PAES, A.C.; MANGIA, S.H.; FLAMÍNIO, A.P.; LARA, G.H.B.; LISTONI, F.J.P. 2009. Perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de animais domésticos na região de Botucatu frente ao cloranfenicol e florfenicol. **Veterinária e Zootecnia**, **16**: 161-172.

PARAJÓ J.C.; DOMÍNGUES H.; DOMÍNGUES J.M. 1998a. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, **65**: 119-121.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. 1998b. Biotechnological production of xylitol. Part 2: operation in culture media made with commercial sugars. **Bioresource Technology**, **65**: 203-212.

PAULA, C.M.D. 2009. **Isolamento, identificação e caracterização de *Shigella* spp. envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul.** Dissertação (Mestrado – Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 70f.

PÉDRON, T.; THIBAUT, C.; SANSONETTI, P.J. 2003. The invasive phenotype of *Shigella flexneri* directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell line caco-2. **The Journal of Biological Chemistry**, **278**: 33.878–33.886.

PEREIRA, A.F.F.; SILVA, T.C.; CALDANA, M.L.; MACHADO, M.A.A.M.; BUZALAF, M.A.R. 2009. Revisão de literatura: utilização do xilitol para a prevenção de otite média aguda. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, **13**: 87-92.

PEREZ, K.J. 2008. **Sobrevivência em fluido gástrico simulado e capacidade de invasão intestinal de *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* induzidas e não induzidas à adaptação ácida**. Dissertação (Mestrado – Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Área de concentração: Microbiologia dos Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 99f.

PIATTI, G.; GAZZOLA, T.; ALLEGRA, L. 1997. Bacterial adherence in smokers and non-smokers. **Pharmacological Research**, **36**: 481-484.

PK HOLDINE B V. Peters Albert Franjo. 2005. **Pharmaceutical composition in the form of a throat spray useful for treating allergies, comprises a zinc salt and xylitol**. NL, NL 1024714C, 09 mai.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Tradução: VOEUX, P.L.; MOREIRA, J.M.S. 2004. **Farmacologia**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 904p.

SAJJAN, U.; MOREIRA, J.; LIU, M.; HUMAR, A.; CHAPARRO, C.; FORSTNER, J.; KESHAYJEE, S. 2004. A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: Inhibition of *Bukholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and xilitol. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, **12**: 1382-1391.

SANO, H.; NAKASHIMA, S.; SONGPAISAN, Y.; PHANTUMVANIT, P. 2007. Effect of xylitol and fluoride containing toothpaste on the remineralization of human enamel *in-vitro*. **Journal of Oral Science**, **49**: 67-73.

SARROUH, B.F. 2009. **Estudo da produção biotecnológica de xilitol em reator de leite fluidizado utilizando bagaço de cana de açúcar e células imobilizadas: avaliação dos parâmetros operacionais e viabilidade econômica**. Tese (Programa de Doutorado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 185f.

SARTORI, M.R.K. 2005. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae)**. Dissertação (Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí - SC, 81f.

SHARON, N. 2006. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1760**: 527-537.

SHARON, N.; OFEK, I. 2000. Safe as mother's milk: Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. **Glycoconjugate Journal**, **17**: 659-664.

STEHLING, E.G. 1999. **Estudo comparativo dos fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de fibrose cística e outras infecções.** Dissertação (Mestrado – Ciências Biológicas. Área de Microbiologia). Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP , 65f.

SILVA, D.D.V.; MANCILHA I.M.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. 2007. Improvement of biotechnological xylitol production by glucose during cultive of *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, **50**: 207-215.

SILVA, F.P. 2008. **Caracterização fitoquímica e atividades biológicas de *Centella asiatica* (L.) Urban.** Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. 150f.

SILVA, J.A.; SILVA, W.D. 2005. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Revista de Patologia Tropical**, **34**: 175-196.

SILVA, S.S.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M.; ROBERTO, I.C. 1994. Xilitol: um adoçante alternativo para indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição (UNESP)**, **5**: 109-117.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M. 2006. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, **29**: 844-855.

SÖDERLING, E.; HIETALA-LENKKERI, A. 2010. Xylitol and erythritol decrease adherence of polysaccharide-producing oral streptococci. **Current Microbiology**, **60**: 25-29.

SUBRAMANIAN, K.; SHANKAR, R.B.; MEENAKSHISUNDARAM, S.; LAKSHMI, B.S.; WILLIAMS, P.H.; BALAKRISHNAN, A. 2008. LamB-mediated adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Journal of Applied Microbiology**, **105**: 715–722.

SUDHA, P.S.; DEVARAJ, H.; DEVARAJ, N. 2001. Adherence of *Shigella dysenteriae* 1 to human colonic mucin. **Current microbiology**, **42**: 381-387.

TAKAHASHI, K.; ONODERA, K.; AKIBA, Y. 1999. Effect of dietary xylitol on growth and inflammatory responses in immune stimulated chickens. **British Poultry Science**, **40**: 552-554.

TAMANINI, C.; HAULY, M.C.O. 2004. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, **25**: 315-330.

TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T.; SAMMALKIVI, L.; IKÄHEINO, I.; KOSKELA, M.; UHARI, M. 2001. Effect of xylitol on growth of *Streptococcus pneumoniae* in the presence of fructose and sorbitol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **45**: 166-169.

TAPIAINEN, T.; SORMUNEN, R.; KAIJALAINEN, T.; KONTIOKARI, T.O.; IKAHEIMO, I.; UHARI, M. 2004. Ultrastructure of *Streptococcus pneumoniae* after exposure to xylitol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **54**: 225-228.

TOMA, C.; NAKASONE N.; MILIWEBSKY, E.; HIGA, N.; RIVAS, M.; SUZUKI, T. 2008. Differential adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* harboring saa to epithelial cells. **International Journal of Medical Microbiology**, **298**: 571-578.

TORQUATO, F.P.L. 2007. **Sensibilidade de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* à desinfecção com luz natural e artificial. Avaliação da capacidade de reativação bacteriana**. Dissertação (Mestrado - Curso de Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande - PB, 120f.

UHARI, M.; KONTIOKARI, T.; KOSKELA, M.; NIEMELA, M. 1996. Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double blind randomized trial. **BMJ**, **313**: 1180-1183.

UHARI, M.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T. 2001. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, **19**: 144-147.

USP – **The United States Pharmacopeia**. 1985. USP XXI, 16th edition.

VANDESKA, E.; AMARTEY, S.; KUZMANOVA, S.; JEFFRIES, T.W. 1996. Fed-Batch culture for xylitol production by *Candida boidinni*. **Process Biochemistry**, **31**: 265-270.

VANMAELE, R.P.; ARMSTRONG, G.D. 1997. Effect of carbon source on localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, **65**: 1408–1413.

VASCONCELOS, U. 2005. **Investigação do antagonismo entre *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias do grupo coliforme**. Dissertação (Mestrado - Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos – Microbiologia Aplicada). Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 135f.

VOIROL, F. 1977. Xylitol becomes part of many foods. **Food Engineering International**, **2**: 40-41.

WIKIPÉDIA. 2008. Disponível em: < http://pt.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli>. Acesso em: 24 set. 2008

WILLER, E.M.; LIMA, R.L.; GIUGLIANO, L.G. 2004. *In vitro* adhesion and invasion inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* clinical strains by human milkproteins. **BMC Microbiology**, **4**: 7 pages.

YLIKAHRI, R. 1979. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Advances in Food Research**, **25**: 159-180.

ZABNER, J.; SEILER, M.P.; LAUNSPACH, J.L.; KARP, P.H.; KEARNEY, W.R.; LOOK, D.C.; SMITH, J.J.; WELSH, M.J. 2000. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **97**: 11.614-11.619.

ANEXO A –