

Inibição *in vitro* da aderência de enteropatógenos pelo xilitol

In vitro inhibition of adhesion of enteropathogens by xylitol

Annelisa Farah da Silva¹, Sílvio Silvério da Silva², Murilo Gomes Oliveira³, Nádia Rezende Barbosa Raposo⁴

¹Mestranda em Ciências Biológicas – Genética e Biotecnologia – Faculdade de Farmácia e Bioquímica – Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA) Universidade Federal de Juiz de Fora; ²Doutor em Tecnologia; Bioquímico-Farmacêutico; ³Doutor em Ciências Biológicas - Microbiologia; ⁴Doutora em Toxicologia

Resumo

O xilitol, um poli-álcool de cinco átomos de carbono, possui diversas aplicações clínicas, destacando-se a ação antiaderente sobre diversas bactérias. Com o surgimento de microorganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais, torna-se essencial a intensificação de pesquisas de novas estratégias para se prevenir e (ou) tratar doenças ocasionadas pela presença desses patógenos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antiaderente do xilitol sobre a cepa *Shigella flexneri* ATCC 12022 e as cepas clínicas (isoladas de pacientes) *Shigella flexneri* e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium. Foram realizados ensaios *in vitro* de atividade antimicrobiana e de atividade antiaderente, sendo, em ambos, o xilitol empregado nas concentrações de 0,5%; 2,5% e 5,0% (p/v). As lamínulas, usadas como corpos de prova no teste de atividade antiaderente, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi constatado que o xilitol não possui propriedade antimicrobiana sobre as cepas testadas; no entanto, as microfotografias obtidas pela MEV revelaram a inibição da aderência microbiana nas lamínulas tratadas com xilitol, sendo esse o provável mecanismo de ação desse composto. Este trabalho confere ao xilitol um maior valor agregado, tornando-o uma biomolécula adequada para ser usada como adjuvante terapêutico, alternativo ao uso dos antibióticos convencionais, para o tratamento de infecções recorrentes do trato gastrointestinal.

Palavras-chave: Xilitol – Aderência bacteriana – Trato gastrointestinal – Bactérias – Prevenção e controle.

Abstract

Xylitol, a five-carbon polyalcohol, has several clinical applications such as the anti-adherent action on many bacteria. Currently, with the emergence of microorganisms resistant to conventional antibiotics, researches for new strategies are necessary, aiming at preventing and/or treating diseases caused by the presence of such pathogens. The present study aimed to evaluate xylitol's antimicrobial and anti-adherence activities on the strain *Shigella flexneri* ATCC 12022 and on the clinical strains (isolated from patients) *Shigella flexneri* and *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *In vitro*, the antimicrobial and anti-adherent activities were tested using 0.5%, 2.5% and 5.0% xylitol. The slides of anti-adherent activity were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). It was found that xylitol does not have antimicrobial properties on the strains tested. However, it was demonstrated, by SEM microphotographs, the inhibition of microbial adherence in slides treated with xylitol, and this is probably the mechanism of action of this compound. This study gives xylitol a greater added value, turning it into an appropriate biomolecule for use as an adjuvant therapeutic, alternative to the use of conventional antibiotics, for the treatment of recurrent infections of the gastrointestinal tract.

Keywords: Xylitol – Bacterial adhesion – Gastrointestinal tract – Bacteria – Prevention and control.

INTRODUÇÃO

O xilitol, um poli-álcool de cinco átomos de carbono, pode ser incorporado em alimentos, por ser considerado um aditivo “geralmente reconhecido como seguro” (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) (MUSSATTO; ROBERTO, 2002; FERREIRA, 2007). Recentes pesquisas com animais e humanos demonstram que o xilitol também possui várias aplicações clínicas, sendo indicado para tratar diabetes, desordens no metabolismo de lipídeos, lesões renais e parenterais, bem como para prevenir otite, infecções pulmonares e osteoporose (MUSSATTO; ROBERTO, 2002).

O xilitol não é fermentado pela maioria dos microrganismos da cavidade bucal humana e, por isso,

é capaz de inibir a desmineralização dos dentes e de exercer efeito não-cariogênico (TAMANINI; HAULY, 2004). Esse efeito decorre do fato de o *Streptococcus mutans*, principal causador das cáries, não utilizar o xilitol como fonte de carbono e de não haver acidificação do pH, o que contribui para o crescimento desse microorganismo. (FERREIRA, 2007)

Existem relatos da atuação antiaderente do xilitol sobre diferentes cepas bacterianas (NAABER et al., 1996; SAJJAN et al., 2004; FERREIRA, 2007). Naaber e colaboradores (1996) estudaram a adesão bacteriana em células Caco-2 da mucosa intestinal e observaram que o xilitol atenuou a aderência e, conseqüentemente, a colonização por *Clostridium difficile*, altamente virulento e considerado responsável pelo processo inflamatório que ocorre na colite pseudomembranosa. A inibição da aderência foi dose-dependente, e acredita-se ser esse o provável mecanismo de ação do xilitol. Ferreira (2007)

Recebido em 11 de dezembro de 2009; revisado em 05 de abril de 2010
Correspondência / Correspondence: Dra. Annelisa Farah da Silva.
Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário
36036-330 Juiz de Fora – MG - Brasil. Tel.: (55) (32) 3229-3809 Email:
nanafarahs@yahoo.com.br

observou, por meio de ensaios *in vitro*, que o xilitol não possui atividade antimicrobiana, mas sim atividade antiaderente sobre a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sendo esse o provável mecanismo de ação do xilitol frente essa bactéria. Além disso, constatou, através de testes *in vivo*, que o xilitol é, provavelmente, uma biomolécula adequada para ser utilizada no tratamento da dermatite atópica, visto que não é irritativo para a pele.

Com o surgimento de patógenos resistentes aos antimicrobianos convencionais, tem-se tornado essencial a intensificação de pesquisas sobre novas estratégias para se prevenir e (ou) tratarem as doenças infecciosas. Uma abordagem bastante promissora se baseia no conhecimento da adesão de microrganismos a diferentes superfícies no hospedeiro e dos mecanismos que impedem essa colonização, em busca da cura da infecção (OFEK; HASTY; SHARON, 2003). Vale ressaltar que, para as bactérias patogênicas do trato gastrointestinal, a aderência ao epitélio é um processo essencial para sua sobrevivência e colonização, uma vez que envolve a liberação de enzimas e toxinas, levando ao início de um processo direto de necrose da célula-alvo e facilitando à invasão (JANKOWSKA et al., 2008).

As bactérias do gênero *Shigella* pertencem à família Enterobacteriaceae, assim como a *Escherichia* e a *Salmonella*. A *Shigella flexneri* é a principal espécie causadora de shigelose endêmica em países em desenvolvimento. A *Shigella sp.* é frequentemente disseminada através do contato direto pessoa – pessoa, por transmissão fecal-oral, ou por consumo de alimentos ou águas contaminados (PAULA, 2009). O potencial patogênico da *Shigella sp.* está relacionado com sua capacidade de invadir e se multiplicar no interior das células do epitélio do cólon intestinal. Embora a invasão seja o último evento observado, a etapa anterior, que envolve a adesão microbiana, é extremamente relevante e, portanto, deve ser considerada (SUDHA; DEVARAJ; DEVARAJ, 2001).

A *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium constitui um grave problema de saúde pública, sendo um importante agente causador de gastroenterite e de graves infecções hospitalares. 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 hospitalizados (TORQUATO, 2007). O resultado da infecção por *Salmonella sp.* é determinado pelo estado do hospedeiro e pela capacidade invasiva da bactéria, que é determinada pelos chamados fatores de virulência. Atualmente, os mecanismos moleculares têm se destacado para a determinação desses fatores, os quais envolvem proteínas, plasmídeos, toxinas, fímbrias e flagelo. Após os bacilos de *Salmonella sp.* chegarem ao intestino, esses microorganismos atravessam a mucosa intestinal e aderem às células epiteliais por meio de

diversos mecanismos, especialmente fímbrias, o que contribui significativamente para a aderência das bactérias ao tecido a ser infectado. (PEREZ, 2008)

Nesse contexto, este trabalho avaliou a atividade antimicrobiana e a propriedade antiaderente do xilitol sobre a cepa *Shigella flexneri* ATCC 12022 e as cepas clínicas (isoladas de pacientes) *Shigella flexneri* e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, colonizadoras do trato gastrointestinal.

MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos realizados, foi empregado xilitol (teor de pureza maior do que 98% - Fluka BioChemika, Suíça). Foram utilizadas três cepas, sendo uma cepa da *American Type Culture Collection (Shigella flexneri* ATCC 12022) e duas cepas selvagens de proveniência clínica, isoladas de fezes, (*Shigella flexneri* clínica e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica) pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU/UFJF).

Atividade antimicrobiana

Foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo Müller Hinton (CMH) para determinação da 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 e foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC's), em meio de cultivo *Tryptone Soy Agar* (TSA), após um período de vinte e quatro horas, a fim de se obter uma suspensão de $10^3 - 10^4$ UFC's. 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 100µL 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 diferentes 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 vinte e quatro horas, conforme adaptação feita a partir de Candan e colaboradores (2003). A CIM foi determinada mediante observação de turvação dos poços, após o período de incubação. O procedimento foi realizado em triplicata.

Atividade antiaderente

As colônias de cada uma das cepas foram ressuspensas em salina estéril, e 200µL dessas

suspensões foram transferidos para 5mL de caldo TSB, as quais foram incubadas a 37°C por vinte e quatro horas. Após esse período, uma alíquota do TSB crescido foi diluída na proporção de 1:10 (v/v) com tampão fosfato 0,1M pH=7,4 (13,6g de fosfato dibásico de potássio e 4,0g de fosfato monobásico de potássio diluídos em água destilada, quantidade suficiente para 1L de solução). Foram calculados os volumes de inóculo correspondente à densidade ótica ($\lambda = 600\text{nm}$) de 0,01 para cada cepa. No grupo-teste, os inóculos foram adicionados aos tubos com capacidade para 50mL, os quais continham 25mL 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) solução desengordurante e lamínula de vidro; b) TSB e lamínula de vidro 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 esses sistemas foram incubados a 37°C por vinte e quatro horas. Decorrido esse intervalo de tempo, as lamínulas foram retiradas e acondicionadas individualmente em tubos com capacidade para 50mL. As suspensões bacterianas contidas nos referidos tubos foram semeadas em TSA e incubadas por vinte e quatro horas a 37°C para posterior contagem das UFC's. As lamínulas foram lavadas (duas vezes) com 10mL de tampão fosfato 0,1M pH=7,4 e, em seguida, foram acrescentados 10mL do mesmo tampão aos tubos, os quais foram sonicados (dois ciclos de dez minutos) a 40 ± 6 KHz. Após a sonicação, as lamínulas foram novamente lavadas (duas vezes) com tampão fosfato 0,1M pH=7,4 e fixadas com glutaraldeído 1% por doze horas. Após esse período, as lamínulas foram lavadas (duas vezes) com tampão fosfato 0,1M pH=7,4; desidratadas com concentrações crescentes de etanol (50% a 100%) com intervalo de vinte minutos entre cada troca; secas à temperatura ambiente e acondicionadas em envelopes de papel sulfite, previamente identificados e esterilizados. Em seguida, as lamínulas foram metalizadas em metalizadora Balzers Union FL – 9496 (Balzers, Alemanha) com 2nm de ouro, durante dois minutos e, posteriormente, analisadas em microscópio eletrônico de varredura JSM 5310 (Jeol, Japão) em alto vácuo, no modo de elétrons secundários. Adicionalmente, foram preparadas diluições seriadas com cada solução pós-sonicação (10^{-2} a 10^{-3}), as quais foram inoculadas em TSA, e as placas incubadas por vinte e quatro horas a 37°C, a fim se de avaliar o crescimento das colônias que não aderiram à lamínula, conforme adaptação feita a partir de Christensen e colaboradores (1982) e de Locatelli e colaboradores (2004). A diluição que ofereceu melhores condições de contagem foi a empregada para a realização dos protocolos experimentais.

Análise estatística

Os resultados da contagem de colônias que não aderiram à lamínula foram expressos como média \pm desvio padrão ($n=2$). Foi realizada a comparação das médias dos números de UFC's desprendidas, por cada tratamento experimental, pelo teste de análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de Tukey. A análise de correlação entre as concentrações de xilitol e o número de células desprendidas foi realizada pelo teste paramétrico de *Pearson*.

RESULTADOS

Atividade antimicrobiana

Para todas as cepas testadas, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Shigella flexneri* clínica e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica, não foi observada a inibição do crescimento bacteriano pelo xilitol, nas concentrações testadas. Não foi observada a turvação do controle negativo e do controle da esterilidade do xilitol nas três concentrações, sendo apenas encontrada a turvação do controle positivo, conforme esperado.

Em relação ao teste com cloranfenicol, foi encontrada, para as cepas *Shigella flexneri* ATCC 12022 e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica, a CIM igual a 25 $\mu\text{g/mL}$ e, para a cepa de *Shigella flexneri* clínica, a CIM foi igual a 250 $\mu\text{g/mL}$.

Atividade antiaderente

Crescimento bacteriano

Para todas as cepas testadas, foi observada uma massa celular incontável nas placas com o meio de cultivo TSA e a suspensão bacteriana do TSB de cada tratamento experimental. Apenas no controle negativo (TSA) não foi observado crescimento celular, garantindo a esterilidade do processo.

Desprendimento bacteriano

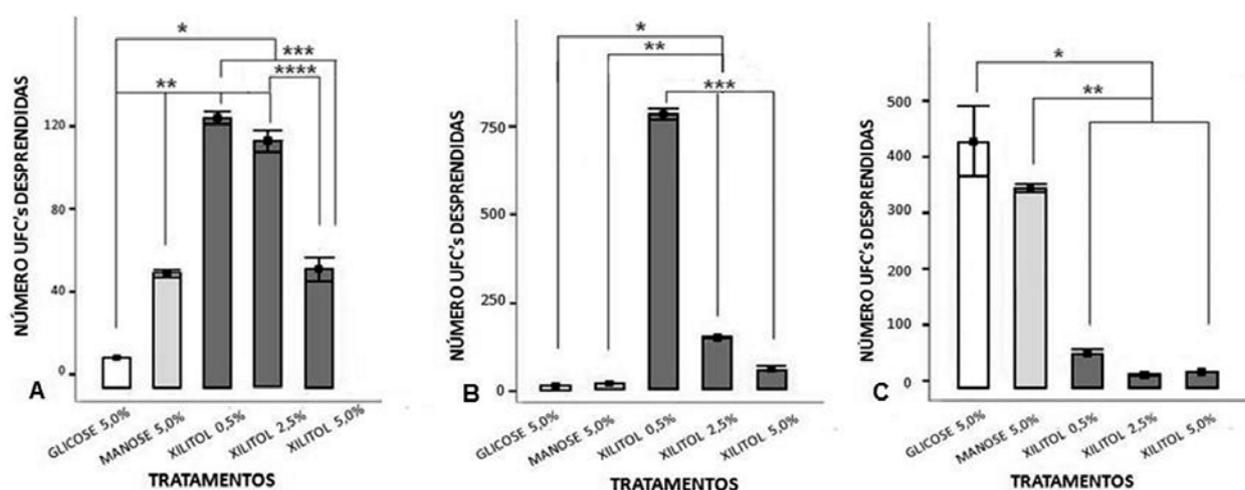
A contagem das UFC's das cepas *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Shigella flexneri* clínica e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica das placas com TSA e as soluções pós-sonicação está demonstrada na Tabela 1. A diferença entre o número de UFC's desprendidas pelos tratamentos experimentais está demonstrada na Figura 1 (A, B e C), para cada cepa, respectivamente.

Os resultados demonstram que, para a cepa *Shigella flexneri* ATCC 12022, não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de células desprendidas pela manose 5,0% e pelo tratamento com xilitol 5,0% ($p=0,998$) e entre os tratamentos com xilitol 0,5% e xilitol 2,5% ($p=0,302$). Em relação à glicose 5,0%, os tratamentos com xilitol, nas três concentrações, foram diferentes estatisticamente ($p<0,01$). Para a cepa *Shigella flexneri* clínica, só não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de células desprendidas pela glicose 5,0% e manose 5,0% ($p=0,973$); e, para a cepa *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica, não houve diferença

Tabela 1 . Desprendimento bacteriano de *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Shigella flexneri* clínica e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica, frente aos tratamentos experimentais.

Tratamentos	UFC'S desprendidas*		
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	<i>Shigella flexneri</i> clínica	<i>Salmonella enterica</i> sorotipo Typhimurium clínica
Controle negativo (TSA)	0	0	0
Controle positivo (glicose 5,0%)	15 ± 1	8 ± 0	442 ± 63
Controle positivo (manose 5,0%)	56 ± 2	15 ± 1	357 ± 6
Xilitol 0,5%	131 ± 3	779 ± 15	65 ± 4
Xilitol 2,5%	120 ± 6	146 ± 2	23 ± 2
Xilitol 5,0%	58 ± 6	56 ± 6	31 ± 1

Nota: * Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=2).

Figura 1 . Número de UFC's desprendidas das cepas A) *S. flexneri* ATCC 12022, B) *S. flexneri* clínica e C) *S. enterica* sorotipo Typhimurium, nos tratamentos experimentais.

Nota: as barras representam o desvio padrão de duas determinações (análise em duplicata) * $p < 0,01$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$ e **** $p < 0,01$ (ANOVA, seguida de Tukey).

estatisticamente significativa entre a quantidade de células desprendidas pelos tratamentos controles (glicose 5,0% e manose 5,0%, $p=0,309$) e entre as três concentrações de xilitol: xilitol 0,5% e xilitol 2,5% ($p=0,848$), xilitol 0,5% e xilitol 5,0% ($p=0,923$) e xilitol 2,5% e xilitol 5,0% ($p=1,00$). Nas demais comparações das médias de UFC's desprendidas pelos tratamentos experimentais, foram encontradas diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,01$). Foi verificada uma elevada correlação negativa entre as concentrações de xilitol e o desprendimento bacteriano, tanto para a cepa de *Shigella flexneri* ATCC 12022 ($r=-0,941$) quanto para a cepa de *Shigella flexneri* clínica ($r=-0,890$).

Aderência bacteriana – MeV

Nos experimentos com *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Shigella flexneri* clínica e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica, não foram encontradas, no

controle negativo, partículas com morfologia e (ou) tamanhos semelhantes a células, indicando que o tratamento aplicado ao corpo de prova foi adequado, conforme as Figuras 2A, 3A e 4A, respectivamente. Foi observada uma expressiva quantidade de células aderidas tanto no controle positivo (glicose 5,0%) (Figura 2B; Figura 3B; Figura 4B) quanto no controle positivo (manose 5,0%) (Figura 2C; Figura 3C; Figura 4C), o que indica que os bacilos, de fato, aderiram ao corpo de prova utilizado na pesquisa. Para a cepa *Shigella flexneri* ATCC 12022, nas amostras incubadas com xilitol a 0,5% (Figura 2D), xilitol a 2,5% (Figura 2E) e xilitol a 5,0% (Figura 2F), foram observados raros bacilos. Para a cepa *Shigella flexneri* clínica, na amostra incubada com xilitol a 0,5% (Figura 3D), foram encontradas células aderidas ao corpo de prova de forma semelhante ao encontrado nos controles-positivos (glicose e manose), enquanto que, nas amostras incubadas com xilitol a 2,5% (Figura

Figura 2. Microfotografias de MEV da cepa *Shigella flexneri* ATCC 12022 frente 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%.

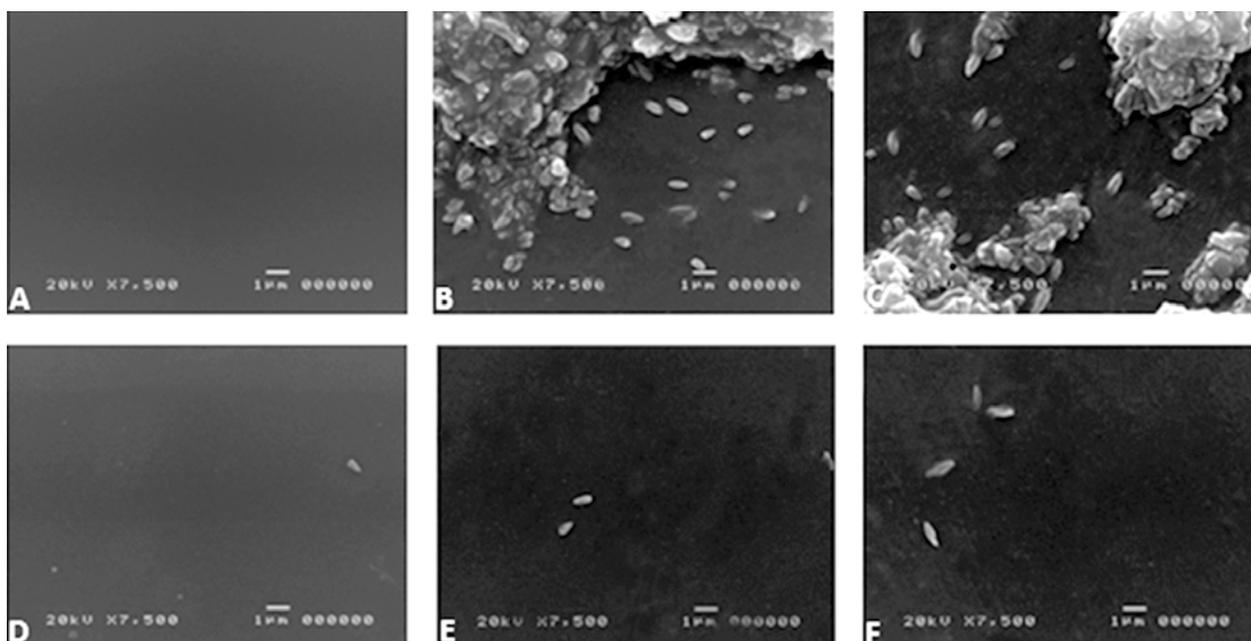
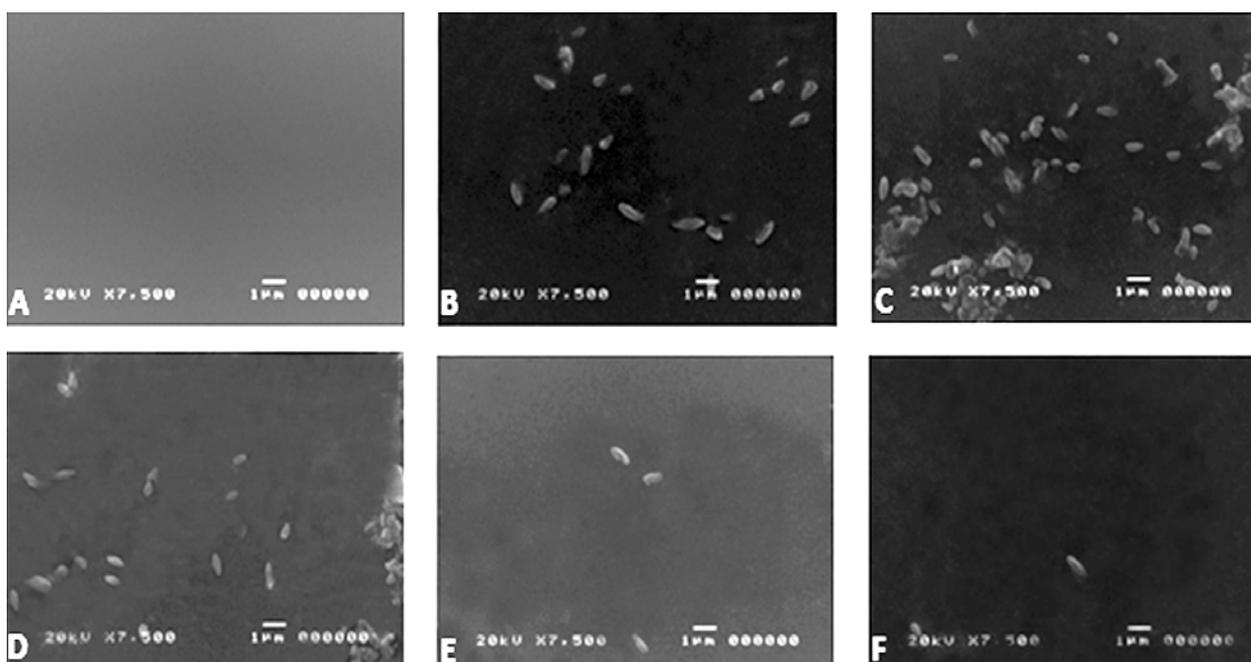


Figura 3. Microfotografias de MEV da cepa *Shigella flexneri* clínica frente aos tratamentos experimentais: A) controle negativo; B) glicose 5,0%; C) manose 5,0%; D) xilitol 0,5%; E) xilitol 2,5%; F) xilitol 5,0%.



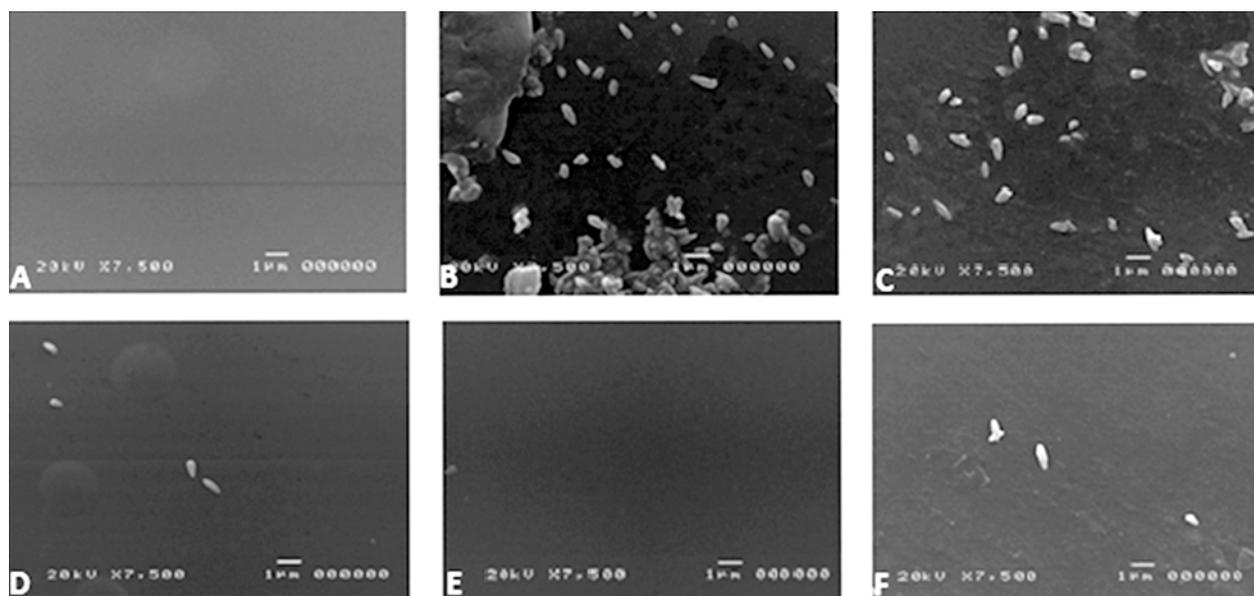
3E) e xilitol a 5,0% (Figura 3F), foram observados raros bacilos. Para a cepa *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica, nas amostras incubadas com xilitol a 2,5% (Figura 4E), não foram observadas células, enquanto, nas amostras incubadas com xilitol a 0,5% (Figura 4D) e com xilitol a 5,0% (Figura 4F), foram observados raros bacilos.

DISCUSSÃO

Atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados com o objetivo de verificar a possível ação antimicrobiana do xilitol sobre as linhagens bacterianas em estudo e, caso fosse confirmada tal hipótese, para identificar a concentração mínima do açúcar capaz de

Figura 4. Microfotografias de MEV da cepa *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica frente 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%.



inibir o crescimento bacteriano. Para todas as cepas testadas, não se observou a inibição do crescimento bacteriano nas três concentrações de xilitol (0,5%, 2,5%, 5,0% p/v).

A literatura reporta a ação antimicrobiana do xilitol sobre alguns microorganismos. Zabner e colaboradores (2000), ao estudarem a fibrose cística, constataram que o *spray* de xilitol (138mM), utilizado por quatro dias em voluntários normais, diminuiu significativamente o número de UFC's de *Staphylococcus coagulase negativa*, quando comparado com solução salina. Além disso, esse *spray* de xilitol aumentou a força iônica do meio, sem interferir na osmolaridade, e inibiu o crescimento bacteriano, estimulando a ação de antibióticos naturais presentes na fina camada de superfície líquida das vias aéreas. Uhari, Tapiainen e Kontiokari (2001) concluíram que o xilitol é uma atrativa alternativa para o tratamento da otite média aguda, pois inibiu o crescimento de *Streptococcus pneumoniae*, ao impedir a ligação dos pneumococos e do *Haemophilus influenzae* nas células nasofaríngeas. Foi verificada, nesse estudo, uma redução de aproximadamente 40% no número de crianças acometidas pela infecção, quando o xilitol foi administrado via goma de mascar, e de aproximadamente 30%, quando administrado via xarope (8,4 – 10,0g/dia, divididos em 5 doses).

Em relação ao uso do cloranfenicol como fármaco de referência, foi observado que a cepa *Shigella flexneri* clínica possui a CIM (250µg/mL) superior ao da *Shigella flexneri* ATCC 12022 (CIM=25µg/mL). Esse resultado demonstra que essa cepa clínica isolada de paciente internado possui uma resistência maior ao antibiótico cloranfenicol do que a cepa ATCC, confirmando seu maior potencial patogênico. O uso clínico

indiscriminado de antimicrobianos exerce papel selecionador de cepas resistentes e, provavelmente, é a principal causa de resistência observada no ambiente hospitalar, onde a pressão do uso dessas drogas é maior.

Atividade antiaderente

Crescimento bacteriano

A massa celular incontável, formada nas placas de todos os tratamentos experimentais, confirma o resultado do ensaio de atividade antimicrobiana para *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Shigella flexneri* clínica e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica: o xilitol não é capaz de impedir o crescimento bacteriano, e, portanto, não possui ação antimicrobiana sobre as cepas estudadas. Ferreira (2007) fez estudo semelhante com *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e obteve resultados similares, constatando que, apesar de o xilitol não possuir propriedade antimicrobiana, ele atua inibindo a aderência da bactéria a uma superfície, sendo esse o seu provável mecanismo de ação.

Desprendimento bacteriano

Nos experimentos com *Shigella flexneri* ATCC 12022 e com *Shigella flexneri* clínica, o número de células desprendidas da lamínula, ou seja, a quantidade de bacilos que não aderiram ao corpo de prova, em ambos os controles positivos (glicose e manose), foi inferior ao número de bacilos encontrados nas placas com xilitol, pois a maioria dos bacilos estariam aderidos à lamínula. Já nos testes realizados com xilitol, foi observado um número maior de UFC's desprendidas, indicando a possível ação antiaderente do composto em estudo. No entanto, foi observada uma correlação negativa entre o desprendimento bacteriano e as concentrações do

açúcar, o que indica que, para essas cepas, não há uma relação de dose-dependência.

Naaber e colaboradores (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 ele possa ocorrer *in vivo* nas células intestinais. Kontiokari, Uhari e Koskela (1998) avaliaram a aderência de microrganismos relacionados com colonização nasal e também com a otite média em três situações: usando células epiteliais expostas a 5% de xilitol, bactérias expostas a 5% de xilitol, e células epiteliais + bactérias expostas a 5% de xilitol. 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*.

No experimento com *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica, era esperado, nos controles positivos (glicose e manose), um número pequeno de células desprendidas, inferior ao encontrado nas placas com xilitol, pois a maioria dos bacilos deveriam estar aderidos à lamínula. Foram utilizados esses dois açúcares, uma vez que ambos estão correlacionados diretamente com a aderência das bactérias do trato gastrointestinal. No entanto, foi encontrado, em ambos os controles positivos, um número maior do que observado no desprendimento pelo xilitol. Uma possível explicação para esses resultados seria a alteração da reologia do meio de cultura, quando aqueles açúcares são adicionados no meio, com a produção de diferentes compostos provenientes do metabolismo da bactéria. Dessa forma, sugere-se que essa cepa, na presença de glicose e manose, pode produzir compostos oriundos de seu metabolismo que diminuam a viscosidade do meio de cultura, permitindo mais circulação de oxigênio e maior crescimento celular. Em relação ao desprendimento bacteriano pelos tratamentos com xilitol, o teste de Tukey demonstrou que as três concentrações desse composto despreendem quantidades estatisticamente iguais de bacilos, ou seja, a atividade antiaderente do xilitol independe de sua concentração para a cepa de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium.

Aderência bacteriana – MeV

Analisando a microfotografia do corpo de prova tratado com xilitol 0,5% da cepa *Shigella flexneri* clínica, não foi observada a redução da quantidade de bacilos aderidos, em relação aos controles-positivo (glicose e manose), o que indica que, para essa cepa, a menor concentração do açúcar não foi suficiente para inibir a aderência. Os resultados da MEV para os demais tratamentos com xilitol da cepa *Shigella flexneri* clínica e das cepas *Shigella flexneri* ATCC 12022 e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium clínica revelam a propriedade de antiaderência desse composto, pois demonstram uma redução expressiva da aderência microbiana nas três

concentrações de xilitol, em relação aos controles positivos.

Os efeitos de diversos compostos sobre a aderência de microrganismos são recentes, e há poucos trabalhos descritos na literatura científica que abordam essa aplicação (SHARON; OFEK, 2000). Os resultados obtidos neste estudo, tanto das microfotografias obtidas pela microscopia quanto da contagem das UFC's desprendidas, indicam que o mecanismo de ação do xilitol está baseado no impedimento da aderência bacteriana. Sajjan e colaboradores (2004) observaram que o xilitol inibiu 67-85% a adesão de *Burkholderia cepacia*. Tapiainen e colaboradores (2004) observaram mudanças na cápsula e na parede celular de *Streptococcus pneumoniae*, após exposição ao xilitol (0,5% – 5,0% por duas horas). A parede celular dos pneumococos 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 de o xilitol alterar a estrutura das bactérias é responsável pela inibição da aderência e, conseqüentemente, pela mudança da virulência de microrganismos.

Os carboidratos estão cada vez mais relacionados com o futuro da terapia antiaderente, podendo ser usados não só na prevenção, mas também no tratamento de diversas doenças. Este estudo reforça a ideia exposta por Sharon (2006): “há pouca dúvida de que inibidores da aderência microbiana irão, num futuro próximo, aderir ao arsenal de drogas para a terapia de doenças infecciosas”.

CONCLUSÕES

As infecções do trato gastrointestinal podem envolver microrganismos multirresistentes a diversos fármacos e, por isso, deve-se evitar o uso irracional de antibióticos. Os resultados encontrados nesta pesquisa conferem ao xilitol maior valor agregado, reforçando sua capacidade de inibir a aderência de diferentes microrganismos. Nesse contexto, o xilitol torna-se uma biomolécula adequada para ser usada como medida preventiva da disseminação de infecções e como adjuvante terapêutico, alternativo ao uso dos antibióticos convencionais para o tratamento de infecções recorrentes do trato gastrointestinal.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro, à Fundação André Tosello pela doação da cepa *Shigella flexneri* ATCC 12022 e à Noêmia Rodrigues pela assistência técnica prestada.

REFERÊNCIAS

CANDAN, F. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). J. Ethnopharmacol., Limerick, v.87, n.2/3, p.215-220, 2003.

- CHRISTENSEN, G.D. et al. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.*, Washington, DC, v.37, n.1, p.318-326, 1982.
- FERREIRA, A.S. Estudo de propriedades microbiológicas e toxicológicas do xilitol visando a sua aplicação no controle da dermatite atópica. 2007. 117f. Dissertação (Mestrado)– Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.
- JANKOWSKA, A. et al. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *J. Biomed. Biotechnol.*, Akron, v.2008, 2008.
- KONTIOKARI, T.; UHARI, M.; KOSKELA, M. Antiadhesive effects of xylitol on otopathogenic bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, London, v.41, n.5, p.563-565, 1998.
- LOCATELLI, C.I. et al. Aderência bacteriana *in vitro* a lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone. *Arq. Bras. Oftalmol.*, São Paulo, v.67, p.241-248, mar./abr. 2004.
- MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Xilitol: edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. *R. Bras. Ci. Farm.*, São Paulo, v.38, n.4, p.401-413, 2002.
- NAABER, P. et al. Inhibition of adhesion of *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, Amsterdam, v.14, n.4, p.205-209, 1996.
- OFEK, I.; HASTY, D.; SHARON, N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, Amsterdam, v.38, n.3, p.181-191, 2003.
- PAULA, C.M.D. Isolamento, identificação e caracterização de *Shigella spp.* envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- PEREZ, K.J. Sobrevivência em fluido gástrico simulado e capacidade de invasão intestinal de *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* induzidas e não induzidas à adaptação ácida. 2008. 99f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- SAJJAN, U. et al. A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: inhibition of *Bukholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and xilitol. *J. Heart Lung Transplant.*, St. Louis, v.23, n.12, p.1382-1391, 2004.
- SHARON, N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1760, n.4, p.527-537, 2006.
- SHARON, N.; OFEK, I. Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. *Glycoconj. J.*, Lund, v.17, n.7/9, p.659-664, 2000.
- SUDHA, P.S.; DEVARAJ, H.; DEVARAJ, N. Adherence of *Shigella dysenteriae 1* to human colonic mucin. *Curr. Microbiol.*, New York, v.42, n.6, p.381-387, 2001.
- TAMANINI, C.; HAULY, M.C.O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Semina Ci. Agr.*, Londrina, v.25, n.4, p.315-330, 2004.
- TAPIAINEN, T. et al. Ultrastructure of *Streptococcus pneumoniae* after exposure to xylitol. *J. Antimicrob. Chemother.*, London, v.54, n.1, p.225-228, 2004.
- TORQUATO, F.P.L. Sensibilidade de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* à desinfecção com luz natural e artificial: avaliação da capacidade de reativação bacteriana. 2007. 120f. Dissertação (Mestrado)-Curso de Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2007.
- UHARI, M.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. *Vaccine*, Amsterdam, v.19, p.144-147, 2001.
- ZABNER, J. et al. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v.97, n.21, p.11614-11619, Oct. 2000.