UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ALINE SIQUEIRA FERREIRA

**Estudo de propriedades microbiológicas e toxicológicas do xilitol visando a
sua aplicação no controle da dermatite atópica**

Lorena – SP
2007

ALINE SIQUEIRA FERREIRA

**Estudo de propriedades microbiológicas e toxicológicas do xilitol visando a
sua aplicação no controle da dermatite atópica**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia
Industrial.

Área de Concentração: Conversão de Biomassa
Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Lorena – SP
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Ferreira, Aline Siqueira

Estudo de propriedades microbiológicas e toxicológicas do xilitol visando a sua aplicação no controle da dermatite atópica / Aline Siqueira Ferreira ; orientador Silvio Silvério da Silva. -- 2007

117 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Biotecnologia 2. Xilitol – uso terapêutico 3. Aderência bacteriana 4. *Staphylococcus aureus* 5. Toxicidade dérmica 6. Dermatite atópica. I. Título.

574.6 - CDU

*Dedico este trabalho aos meus
pais, Cacá e Paulo.
Amo vocês.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força durante todo este estudo.

Ao Prof. Dr. Silvio Silvério, pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos transmitidos, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela amizade e contribuição para o amadurecimento científico e pessoal.

À Profa. Dra. Nádia, pelo agradável convívio, amizade, confiança, e pelos ensinamentos de vida e acadêmicos. Sua valiosa co-orientação foi imprescindível durante toda a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio, pela amizade, pelas valiosas orientações desde o início da faculdade, e por me permitir utilizar toda a infra-estrutura do laboratório sob sua coordenação.

À Profa. M. Sc. Miriam, por sempre acreditar no meu trabalho, pelos conselhos e pela amizade.

À Dra. Larissa Canilha, por fornecer gentilmente o xilitol produzido e purificado pela via biotecnológica, e também pela amizade.

À colega Tânia Sumita, pela doação da cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 utilizada neste trabalho.

Aos professores do DEBIQ, especialmente Arnaldo Márcio, Adriane, Graça, Ismael, Francislene e Inês, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas e amigos da EEL/ USP: Amanda, André, Baby, Boutros, Carlos, Cláudio, Dani Borba, Diego, Fernanda Bernardi, Fran, Gina, Giovani, João Paulo, Juan, Juliana Frade, Lucilene, Mário, Michel, Júlio, Olívia, Priscila Filgueiras, Pri Vaz, Ricardo, Rogério, Soninha, Talita, Tânia, Tatiane, Waltinho, pela amizade, ajuda e apoio.

À Taís, especialmente, pela amizade e companhia, e pela paciência em me escutar sempre, no ano em que moramos juntas.

Aos meus amigos da FFB/ UFJF, Adriana, Érika, Fred, Humberto, Mariana, Priscila, Rafael e Raphael, pelo convívio, auxílio e amizade.

À Sylvia, Juliana, Amanda, Cláudia e Marita, por sempre me acolherem nas suas casas de braços abertos.

Ao Joel e demais funcionários da biblioteca, sempre dispostos a ajudar na procura de referências e livros, e na elaboração da ficha catalográfica. Ao Isnaldi, pela ajuda e amizade. Ao Paulinho, Jussara e Nicamor, pelo apoio e amizade.

À Fatinha e Vaneida (FFB/ UFJF), e à Rita e Lílian (EEL/ USP) pela amizade, carinho e ajuda incondicional e despretenciosa.

Ao Dr. Durval e ao M. Sc. Jorge, pelo auxílio nas fotomicrografias de MEV.

Aos meus pais, Cacá e Paulo, pelo amor, carinho, apoio e ajuda incondicionais.

Aos meus irmãos, Paulinho e Lú, pelas alegrias, amizade e exemplos de vida.

Ao Diogo, pela companhia, paciência, pelas alegrias e por me compreender sempre.

A todos os meus amigos, que não estavam diretamente relacionados ao mestrado, pela amizade e apoio, e por entenderem minhas ausências.

À CAPES e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

RESUMO

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

O crescente aumento da resistência microbiana aos antibióticos disponíveis impulsiona a busca por novas substâncias, com características superiores às correntemente usadas. Neste sentido, este trabalho propôs investigar as propriedades terapêuticas do xilitol visando a sua aplicação no controle da dermatite atópica, patologia que acomete a pele e que é agravada pela presença da bactéria *Staphylococcus aureus*. No presente estudo foram executados ensaios *in vitro* de atividade antimicrobiana do xilitol e verificado se este composto atua na aderência bacteriana, sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Foi avaliada a ação do xilitol produzido tanto pela via química quanto pela biotecnológica, sendo este último obtido a partir de fermentação do hidrolisado hemicelulósico da palha de trigo, nas concentrações de 1, 5 e 10 % (p/ v). A seguir, foram executados testes de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas com xilitol nas concentrações de 5 e 10 % (p/ p), nas formas farmacêuticas de creme e de gel, em coelhos albinos da raça Nova Zelândia e testes de fototoxicidade, na concentração de 10 % (p/ p), nas formas farmacêuticas de creme e de gel, utilizando cobaias albinas da raça *Durkin-Hartley*. Em relação aos ensaios *in vitro*, observou-se que o xilitol, nas concentrações testadas, não impediu o crescimento bacteriano, mas inibiu a aderência da bactéria a uma superfície de prova, evidenciando ser este o provável mecanismo de ação desta substância sobre as bactérias. Em testes toxicológicos realizados, todas as formulações contendo xilitol foram classificadas como não irritantes quando foram avaliadas quanto à toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. Entretanto, nos testes da fototoxicidade, as formulações testadas apresentaram certa fototoxicidade, sugerindo ser a formulação a base de creme mais fototóxica do que aquela a base de gel. Estes resultados evidenciam a aplicabilidade do xilitol no controle da dermatite atópica, como princípio ativo de formulações seguras, observando que a aplicação deve ser realizada com o uso de protetor solar. Este estudo buscou contribuir de maneira expressiva na elucidação do mecanismo de ação do xilitol e verificar os cuidados que devem ser considerados quando realizada sua aplicação pela via dérmica.

Palavras-chave: Biotecnologia. Xilitol – uso terapêutico. Aderência bacteriana. *Staphylococcus aureus*. Toxicidade dérmica. Dermatite atópica.

ABSTRACT

FERREIRA, A. S. **Study of microbiological and toxicological properties of xylitol and its application on atopic dermatitis control.** 2007. 117 f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

Since the microorganisms' resistance to antibiotics increases, it is imperative to look for different substances that can combat these pathogens growth, with greater advantages. The propose of this work was to study therapeutic properties of xylitol in order to control atopic dermatitis, a dermal disease characterized by the presence of *Staphylococcus aureus* bacterium. Xylitol is a substance that can be obtained by chemical and biotechnological means, being the latter a relevant alternative that produces high-value compounds obtained by fermentation of lignocelulosic hydrolysates. In the present study *in vitro* assays were performed in order to check if xylitol (obtained by chemical and biotechnological means) has antimicrobial activity at 1, 5 and 10 % (w/ v) concentrations. Other assays were also performed to verify if xylitol properties, at the same concentrations, hinder the adherence of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bacterium. Xylitol was produced by biotechnological means using wheat straw hemicellulosic hydrolysate. Afterwards, *in vivo* assays were performed to investigate if xylitol is safe for skin application. Acute dermal toxicity tests with repeated doses were done with New Zealand rabbits using concentrations of 5 and 10 % (w/ w) xylitol, in either cream or gel. Phototoxicity assays were also performed with *Durkin-Hartley* guinea pigs, using only 10 % (w/ w) xylitol, in cream and gel forms. It was observed that xylitol does not have antimicrobial properties on *S. aureus* at all tested concentrations, but this compound has the capability of inhibiting this bacterium adherence on a surface, at all tested concentrations. In relation to toxicity assays, formulations containing xylitol are non-irritative. However, xylitol has phototoxicity properties, mainly when cream is the base. Xylitol is an adequate alternative to be applied for atopic dermatitis control, and its application on the skin should be done with sunscreen. This study aimed to clarify xylitol action mechanism and to check the cares that should be taken when xylitol is applied on skin.

Key-words: Biotechnology. Xylitol – therapeutic use. Bacterial adherence. *Staphylococcus aureus*. Dermal toxicity. Atopic dermatitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Manifestações da dermatite atópica	21
Figura 2.	<i>Staphylococcus aureus</i> . Cocos Gram positivos, agrupados em cachos	25
Figura 3.	Colônias de <i>S. aureus</i> em ágar sangue	26
Figura 4.	Fórmula estrutural e arranjo espacial do xilitol	30
Figura 5.	Tecnologias disponíveis para a produção de xilitol	33
Figura 6.	Frutas	33
Figura 7.	Xilose	33
Figura 8.	Bagaço de cana-de-açúcar	33
Figura 9.	Xilitol	33
Figura 10.	Cobaia Albina, raça <i>Durkin-Harthley</i>	44
Figura 11.	Coelhos albinos, raça Nova Zelândia	45
Figura 12.	Tubos de ensaio ilustrando a não inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 por xilitol produzido pela via química	58
Figura 13.	Tubos de ensaio ilustrando a não inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 por xilitol produzido pela via biotecnológica	58
Figura 14.	Células de <i>S. aureus</i> , cultivadas em TSB contendo glicose 5,0 %, aderidas ao corpo de prova (aumento de 5000X)	61
Figura 15.	Ausência de células de <i>S. aureus</i> , cultivadas em TSB contendo xilitol 1,0 % produzido pela via química (aumento de 5000X)	62
Figura 16.	Ausência de células de <i>S. aureus</i> , cultivadas em TSB contendo xilitol 5,0 % produzido pela via química (aumento de 5000X)	62
Figura 17.	Ausência de células de <i>S. aureus</i> , cultivadas em TSB contendo xilitol 10,0 % produzido pela via química (aumento de 5000X)	63

Figura 18.	Ausência de células de <i>S. aureus</i> , cultivadas em TSB contendo xilitol 1,0 % produzido pela biotecnológica (aumento de 5000X)	63
Figura 19.	Ausência de células de <i>S. aureus</i> , cultivadas em TSB contendo xilitol 5,0 % produzido pela biotecnológica (aumento de 5000X)	64
Figura 20.	Ausência de células de <i>S. aureus</i> , cultivadas em TSB contendo xilitol 10,0 % produzido pela biotecnológica (aumento de 5000X)	64
Figura 21.	Ausência de partículas com formas e/ ou tamanhos semelhantes a células indicam que o tratamento aplicado ao corpo de prova é adequado	65
Figura 22.	Leitura do animal número 2 no 4º dia do ensaio de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. (Formulação-teste xilitol 5,0 % em gel, controle gel de carbopol, mostrando eritema leve presente nas quatro regiões avaliadas e ausência de edema)	71
Figura 23.	Leitura do animal número 9 no 1º dia do ensaio de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. (Formulação-teste xilitol 5,0 % em creme, controle creme lanette, mostrando ausência de eritema de edema nas quatro regiões avaliadas)	71
Figura 24.	Ausência de reações fototóxicas. Animal número 5 (controle), 1 h após a irradiação	74
Figura 25.	Presença de eritema e de edema. Animal número 1, 24 h após a irradiação. Região A: controle do xilitol: ausência de reações; região B: controle do 8-MOP: presença de eritema leve: região C: teste do xilitol: presença de edema leve: região D: presença de eritema e edema leves	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Propriedades físico-químicas do xilitol	31
Tabela 2 –	Resultados relacionados à produção de xilitol pela via biotecnológica, utilizando frascos Erlenmeyer, obtidos por pesquisadores do GMBio	34
Tabela 3 –	Resultados relacionados à produção de xilitol pela via biotecnológica, utilizando fermentadores, obtidos por pesquisadores do GMBio	35
Tabela 4 –	Valores das UFC/ mL de cada sonicado e suas respectivas diluições	60
Tabela 5 –	Monitoramento do peso dos animais durante o ensaio de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. Formulação-teste: xilitol em gel de carbopol a 5,0 % (p/ p)	67
Tabela 6 –	Monitoramento do peso dos animais durante o ensaio de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. Formulação-teste: xilitol em gel de carbopol a 10,0 % (p/ p)	68
Tabela 7 –	Monitoramento do peso dos animais durante o ensaio de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. Formulação-teste: xilitol em creme lanette a 5,0 % (p/ p)	68
Tabela 8 –	Monitoramento do peso dos animais durante o ensaio de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. Formulação-teste: xilitol em creme lanette a 10,0 % (p/ p)	68
Tabela 9 –	Valores finais referentes ao tratamento dos dados obtidos dos testes de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas	70
Tabela 10 –	Monitoramento do peso dos animais durante o ensaio de fototoxicidade. Formulação-teste: xilitol em gel de carbopos a 10,0 % (p/ p)	73
Tabela 11 –	Monitoramento do peso dos animais durante o ensaio de fototoxicidade. Formulação-teste: xilitol em gel de	

	carbopos a 10,0 % (p/ p)	73
Tabela 12 –	Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação gel de carbopol com xilitol a 5,0 % (p/ p)	95
Tabela 13 –	Avaliação da formação de edemas da formulação gel de carbopol com xilitol a 5,0 % (p/ p)	96
Tabela 14 –	Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação gel de carbopol (controle)	97
Tabela 15 –	Avaliação da formação de edemas da formulação gel de carbopol (controle)	98
Tabela 16 –	Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação gel de carbopol com xilitol a 10,0 % (p/ p)	99
Tabela 17 –	Avaliação da formação de edemas da formulação gel de carbopol com xilitol a 10,0 % (p/ p)	100
Tabela 18 –	Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação gel de carbopol (controle)	101
Tabela 19 –	Avaliação da formação de edemas da formulação gel de carbopol (controle)	102
Tabela 20–	Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação gel de carbopol com xilitol a 5,0 % (p/ p)	103
Tabela 21 –	Avaliação da formação de edemas da formulação creme lanette com xilitol a 5,0 % (p/ p)	104
Tabela 22 –	Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação creme lanette (controle)	105
Tabela 23 –	Avaliação da formação de edemas da formulação creme lanette (controle)	106
Tabela 24 –	Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação creme lanette com xilitol a 10,0 % (p/ p)	107
Tabela 25 –	Avaliação da formação de edemas da formulação creme lanette com xilitol a 10,0 % (p/ p)	108
Tabela 26 –	Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação creme lanette (controle)	109

Tabela 27 –	Avaliação da formação de edemas da formulação creme lanette (controle)	110
Tabela 28 –	Avaliação da formação de eritemas, escaras e edemas das formulações xilitol em gel, 8 – MOP em gel e da base	111
Tabela 29 –	Avaliação da formação de eritemas, escaras e edemas das formulações xilitol em creme, 8 – MOP em creme e da base	112

LISTA DE SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Imuno Deficiency Syndrome</i>
DNA	<i>desoxirribonucleic acid</i>
PCR	<i>polimerase chain reaction</i>
GMBio	Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos
EEL	Escola de Engenharia de Lorena
USP	Universidade de São Paulo
FTI	Fundação de Tecnologia Industrial
DA	Dermatite atópica
PVP-I	iodo polivinilpirrolidona
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
JECFA	<i>Joint Expert Committee on Food Additives</i>
FAO	<i>Food and Agricultural Organization</i>
ADI	<i>Acceptable Daily Intake</i>
DIMED	Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Medicamentos do Ministério da Saúde
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
X	concentração de células
So	concentração inicial de xilose
Q _P	produtividade volumétrica de xilitol
Y _{P/S}	fator de conversão de xilose em xilitol
rpm	rotações por minuto
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto
k _{La}	coeficiente de transferência de oxigênio
PM	peso molecular
BCC	<i>Burkholderia cepacia</i> complexo
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CPMP	<i>Committee for Proprietary Medicinal Products</i>
EMA	<i>The European Agency of the Evaluation of Medicinal Products</i>
HERA	<i>Human and Environmental Risk Assessment</i>

NIQUA	Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica
FFB	Faculdade de Farmácia e Bioquímica
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
FAENQUIL	Faculdade de Engenharia Química de Lorena
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>
MEV	Microscopia/ Microscópio Eletrônico de Varredura
MG	Minas Gerais
UVA	radiação ultra-violeta do tipo A
ANOVA	Análise de Variância
UVB	radiação ultra-violeta do tipo B
UVC	radiação ultra-violeta do tipo C

LISTA DE ABREVIATURAS

IgE	imunoglobulina E
Th ₂	linfócito T <i>helper</i> do tipo 2
S	Svanberg
L.	Lineu
O/ F	oxidação/ fermentação
DL ₅₀	dose letal média em 50 % de uma determinada população em estudo
g/ kg	grama (s) por quilograma (s)
g/ mol	grama (s) por mol (es)
°C	grau (s) Celsius
mm Hg	milímetro (s) de mercúrio
g	grama (s)
cP	centiPoise
cal	caloria (s)
kJ	kilojoule (s)
UR	umidade relativa
temp	temperatura
n°	número
kcal	kilocaloria (s)
RNA-m	ácido ribonucléico do tipo mensageiro
IL-8	interleucina 8
SBD	defensinas
ECA	enzima coversora de angiotensinogênio
mg	miligrama (s)
TSA	<i>Tryptone Soy Agar</i>
nm	nanômetro (s)
s	segundo (s)
v/ v	volume/ volume
p/ p	peso/ peso
T	transmitância
UV-Vis	ultra-violeta e visível
PCA	<i>Plate Count Agar</i>

h	hora (s)
UFC/ mL	unidades formadoras de colônia por mililitro
p/ v	peso/ volume
TSB	<i>Trypiti Soy Broth</i>
BP	<i>Baird-Parker</i>
μL	microlitro (s)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
DO	densidade óptica
g	gravidade
KHz	kilohertz (s)
min	minuto (s)
cm ²	centímetro (s) quadrado (s)
8-MOP	8- metoxipsoraleno
W	watt (s)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
n	número de elementos de uma amostra
GL	graus de liberdade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Gerais	20
1.1.2	Específicos	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	DERMATITE ATÓPICA	21
2.2	TERAPIAS UTILIZADAS E POTENCIAIS NO CONTROLE DA DERMATITE ATÓPICA	23
2.3	MICROBIOLOGIA DA BACTÉRIA <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.4	NOVAS TENDÊNCIAS NO CONTROLE DE INFECÇÕES BACTERIANAS	27
2.5	XILITOL: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E TOXICIDADE	29
2.6	XILITOL: PRODUÇÃO	32
2.7	XILITOL: PROPRIEDADES ANTI-ADERENTES SOBRE BACTÉRIAS	36
2.8	OUTRAS APLICAÇÕES CLÍNICAS DO XILITOL	38
2.9	ANIMAIS DE LABORATÓRIO	42
2.10	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	45
3	MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1	MICROORGANISMO E MEIO DE CONSERVAÇÃO	47
3.2	XILITOL	47
3.3	PREPARO DE MATERIAL	47
3.3.1	Ensaio microbiológico	47
3.3.2	Ensaio biológico	48
3.3.2.1	Laboratório de alocação dos animais	48
3.3.2.2	Formulações-teste	49
3.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>S. aureus</i> FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE XILITOL	50
3.4.1	Preparo da suspensão bacteriana	50
3.4.2	Padronização da suspensão bacteriana	50

3.4.3	Diluição seriada da suspensão bacteriana	50
3.4.4	Avaliação da ação bactericida/ bacteriostática do xilitol sobre a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	50
3.5	AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE DE ANTI-ADERÊNCIA BACTERIANA DO XILITOL	51
3.5.1	Cultivo de <i>S. aureus</i>	51
3.5.2	Preparo da suspensão bacteriana	51
3.5.3	Preparo dos sistemas para incubação	52
3.5.4	Preparo das lamínulas para a microscopia eletrônica	52
3.5.5	Avaliação do crescimento no meio de cultivo	53
3.5.6	Avaliação do número de unidades formadoras de colônias desprendidas das lamínulas	53
3.5.7	Microscopia eletrônica de varredura	53
3.6	ANIMAIS DE LABORATÓRIO	54
3.7	ENSAIOS DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA COM DOSES REPETIDAS DO XILITOL	55
3.8	ENSAIOS DE FOTOTOXICIDADE DO XILITOL	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>S. aureus</i> FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE XILITOL	57
4.2	AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE DE ANTI-ADERÊNCIA BACTERIANA DO XILITOL	59
4.2.1	Avaliação do crescimento no meio de cultivo	59
4.2.2	Avaliação do número de unidades formadoras de colônias desprendidas das lamínulas	60
4.2.3	Microscopia eletrônica de varredura	60
4.3	ENSAIOS DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA COM DOSES REPETIDAS DO XILITOL	67
4.3.1	Monitoramento do peso dos animais	67
4.3.2	Observação diária das reações de eritema e edema	69
4.3.3	Classificação do grau de irritabilidade das formulações contendo xilitol	69
4.4	ENSAIOS DE FOTOTOXICIDADE DO XILITOL	72

4.4.1	Monitoramento do peso dos animais	72
4.4.2	Observação diária das reações de eritema e edema	73
4.4.3	Classificação da fototoxicidade das formulações contendo xilitol	75
5	CONCLUSÕES	77
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	78
	REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE A -	Fluxograma ilustrando as etapas de avaliação da propriedade de anti-aderência bacteriana do xilitol	93
APÊNDICE B -	Tabelas referentes aos resultados obtidos dos ensaios de toxicidade dérmica aguda do xilitol com doses repetidas	95
APÊNDICE C -	Tabelas referentes aos resultados obtidos dos ensaios de fototoxicidade do xilitol	111
ANEXO A -	Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas)	113
ANEXO B -	Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de fototoxicidade)	114
ANEXO C -	Cópia dos Protocolos de Aprovação do Comitê de Ética referentes aos ensaios executados neste estudo utilizando animais	115

1 INTRODUÇÃO

Existem mais de 370 fármacos e vacinas de origem biotecnológica com aplicações clínicas em mais de 200 patologias incluindo vários tipos de câncer, doença de Alzheimer, problemas cardíacos, diabetes, esclerose múltipla, AIDS e artrites. A biotecnologia é a responsável também por centenas de testes de diagnósticos que permitem a detecção e o tratamento precoce de várias doenças com maior sucesso. Atribui-se ainda à biotecnologia outras aplicações, como alimentos funcionais, bioinseticidas, tratamento mais adequado de despejos tóxicos, testes de ácido desoxirribonucléico (DNA) e reação de cadeia da polimerase (PCR). Um dos destaques da biotecnologia, o qual é abordado neste trabalho, é a utilização de bioprodutos, produzidos por microrganismos, como agentes terapêuticos. Tais compostos são compatíveis com os tecidos e rapidamente absorvidos pelo organismo, sendo superiores aos fármacos manufaturados (ERAMIAN et al., 2004, p. 3).

O presente trabalho está inserido na Área de Conversão de Biomassa do grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL) da Universidade de São Paulo (USP). Uma das abordagens do grupo visa estudar parâmetros e processos fermentativos utilizando a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 para a produção de xilitol, um poliol que possui várias aplicações nas indústrias alimentícia, médico-farmacêutica e odontológica. Os estudos envolvendo o aproveitamento dos materiais lignocelulósicos para a produção de xilitol é uma linha de pesquisa bastante consolidada no GMBio dotando-o de um forte conhecimento científico e domínio de técnicas de fermentação de lignocelulósicos para a produção do xilitol.

Ressalta-se que diversos aspectos deste processo fermentativo já foram enfocados, destacando-se estudos iniciais de estabelecimento de parâmetros fermentativos em meios sintético e a base de hidrolisados hemicelulósicos. Nestes estudos ficou comprovada a potencialidade da utilização de resíduos de biomassa vegetal para a produção biotecnológica de xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037. Entretanto, alguns pontos críticos encontram-se ainda em fase de observação e estudos visando a uma melhoria do processo fermentativo.

O xilitol, sendo o produto alvo destes estudos, com todas as suas comprovadas propriedades de interesse, é o objeto de estudo deste trabalho com uma nova abordagem. De acordo com os resultados obtidos e observados nos estudos de produção de xilitol, surgiu neste estágio de desenvolvimento científico-tecnológico, a necessidade de realizar estudos visando aplicações farmacológicas do produto obtido, aumentando seu valor agregado. Assim, este trabalho procurou verificar e explorar as propriedades farmacológicas do xilitol em uma patologia de grande importância para o Brasil, a dermatite atópica (DA). Esta merece destaque uma vez que existem poucas opções de tratamento e se verifica um aumento de sua incidência nos últimos anos em diferentes faixas da população. A DA se caracteriza por um processo inflamatório o qual é comumente colonizado pela bactéria *Staphylococcus aureus*. As manchas na pele originadas por este processo apresentam prurido, vermelhidão e em alguns casos prejudicam significativamente a qualidade de vida dos portadores.

Considerando as ações do xilitol contra algumas bactérias, o presente trabalho visou elucidar seu mecanismo de ação sobre os microrganismos, destacando a bactéria *S. aureus*, e testes toxicológicos foram executados para verificar sua segurança para aplicação dérmica, contribuindo assim como uma nova estratégia e opção para o tratamento da dermatite atópica.

Dessa forma, esse trabalho foi uma proposta inovadora dentro do GMBio/ EEL-USP, que contribuirá para a ampliação das áreas de atuação, principalmente naquelas consideradas prioritárias dentro da biotecnologia moderna.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Gerais

- Avaliar a influência do xilitol na atividade antimicrobiana e na propriedade de anti-aderência sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar, por meio de ensaios toxicológicos, a segurança do xilitol para aplicação dérmica.

1.1.2 Específicos

- Verificar o efeito da concentração de xilitol na atividade antimicrobiana frente a bactéria *S. aureus*;
- Verificar a capacidade anti-aderente do xilitol em diferentes concentrações sobre a bactéria *S. aureus* em experimentos *in vitro*;
- Elaborar formulações terapêuticas nas formas de creme e de gel contendo xilitol como único princípio ativo;
- Determinar a toxicidade dérmica aguda com doses repetidas e a fototoxicidade das preparações contendo xilitol ao serem executados experimentos *in vivo*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DERMATITE ATÓPICA

A dermatite atópica é uma erupção crônica intensamente pruriginosa (ARNDT, 1987, p. 19) que não pode ser curada, mas sim tratada (GAMONAL; DUTRA, 2002, p. 85). Sua etiopatologia são antígenos complexos (inalantes, alimentos) ou fatores psicogênicos. As lesões se caracterizam por erupções eritematosas, com pápulas e vesículas escamosas, com tendência à liquenificação. Tais lesões se distribuem principalmente na face, em crianças, e nas dobras cutâneas, em indivíduos adultos, e se caracterizam por intenso prurido. Para o diagnóstico, além do histórico do paciente e morfologia das lesões, dosagens de imunoglobulina E (IgE), eosinofilia e testes por escarificação podem ser úteis como auxiliares. (AZULAY; AZULAY, 1992, p. 62). Na figura 1 podem ser visualizadas algumas manifestações da dermatite atópica.

Figura 1. Manifestações da dermatite atópica

Fontes: Merck, 2005; UMMC, 2005; Medstat, 2005; Dermenetnz, 2005.

A dermatite atópica é uma desordem determinada geneticamente, mas que é influenciada por diversos fatores endógenos e exógenos (ADACHI; AKAMATSU; HORIO, 2002, p. 76), como a presença de casos de asma, rinite alérgica, conjuntivite no histórico familiar e uma tendência em produzir IgE, um tipo de anticorpo, em maiores quantidades, o que é relacionado com um perfil de produção de citocina mediado por linfócitos T *helper* do tipo 2 (Th₂) (HIKITA et al., 2002, p. 143). Em várias partes do mundo, em especial na porção oeste do globo, há um aumento dos casos de DA, principalmente em crianças (primeiros 3 anos de vida) e adolescentes. Nos países nórdicos essa incidência varia entre 10-12 %, e apesar dos estudos acerca dessa fisiopatologia, esta continua como uma condição crônica em muitos pacientes e sua terapia é ainda baseada no alívio dos sintomas (CERIO, 1997, p. 6; FAERGEMANN, 1997, p. 217).

Conforme observaram Watanabe et al. (2003, p. 589), não há diferença da manifestação da doença entre os sexos. Quatro medidas podem ajudar a aliviar os sintomas tais como i) o combate ao ressecamento da pele; ii) o controle do prurido; iii) o combate da infecção, que pode ser latente, com antibióticos; iv) e a administração de medicamentos que ajudam a controlar a resposta do sistema imune, como os corticóides e imunomoduladores tópicos. O principal sintoma é o prurido, que pode iniciar antes mesmo das lesões cutâneas se manifestarem. Na infância as lesões são avermelhadas e descamativas, podendo atingir face, tronco e membros e com o ato de coçar, tornam-se escoriadas e podem sofrer infecções secundárias. Nos adolescentes e adultos, as lesões localizam-se preferencialmente nas áreas de dobras da pele, como a região posterior dos joelhos, pescoço e dobras dos braços e a pele destes locais torna-se mais grossa, áspera e escurecida. Usualmente localizada nestas áreas, a dermatite atópica pode se generalizar, atingindo grandes áreas corporais (ARNDT, 1987, p. 21; AZULAY; AZULAY, 1992, p. 62; GAMONAL; DUTRA, 2002, p. 85).

A colonização por *Staphylococcus aureus* é comum nas áreas afetadas pela dermatite atópica e é a responsável por acentuá-la. Alguns pacientes podem atuar como reservatórios e transmitir este microrganismo a pessoas saudáveis, o que, em algumas situações, é um alarmante caso de Saúde Pública. O mecanismo pelo qual essa bactéria agrava a dermatite atópica ainda não está totalmente esclarecido, mas certamente o processo inflamatório decorrente é prejudicado pela elevada liberação de toxinas (WILLIAMS et al., 1999, p. 207). Pacientes portadores de dermatite atópica são colonizados por grande número de *S. aureus* na ausência de sinais clínicos de infecção (CORK, 1996, p. 32).

Segundo Cerio (1997, p. 7) esta patologia afeta não somente a qualidade de vida dos pacientes, mas também dos seus familiares e pode acarretar em efeitos psicológicos em adolescentes. Dentro deste contexto ressalta-se a importância de pesquisar uma terapia potencial que seja segura e eficaz para atender ao tratamento desta demanda de mercado.

2.2 TERAPIAS UTILIZADAS E POTENCIAIS NO CONTROLE DA DERMATITE ATÓPICA

Faergemann (1997, p. 219-220) testou a concentração inibitória mínima de hexilenoglicol (4,8 %) e fluorato de mometasona (0,1 %) em creme e obteve resultados satisfatórios para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. No entanto, após a interrupção do tratamento por quatro semanas, os pacientes foram recolonizados e apresentaram a mesma carga microbiana inicial. Williams et al. (1998, p. 207) afirmam que os corticóides não atuam diretamente na bactéria. Se por um lado isso não causa resistência à terapia, por outro lado não atuam efetivamente no controle da infecção da doença. Poyner e Dass (1996, p. 29) obtiveram resultados satisfatórios no controle da dermatite atópica utilizando combinações de ácido fusídico/ fusidato de sódio, juntamente com a administração de hidrocortisona 1 %. No entanto, tais associações podem levar à resistência microbiana e não curam efetivamente as feridas. Akiyama et al. (1997, p. 28) testaram iodo- polivinilpirrolidona (PVP- I) no controle da dermatite atópica. Apesar do iodo ser um excelente antisséptico, os autores observaram um aumento da irritação causado pelo iodo; além disso, houve absorção sistêmica do iodo causando alterações na glândula tireóide. Dessa forma, o iodo deve ter seu uso abolido no controle dessa patologia.

Adachi, Akmatsu e Horio (2002, p. 82) postularam três mecanismos de resistência microbiana aos macrolídeos (antibióticos que bloqueiam a síntese proteica ao se ligarem à fração 50 S dos ribossomos), como i) a modificação da estrutura 50 S dos ribossomos aos quais estes antibióticos se ligam; ii) a habilidade de sintetizar enzimas que inativam os macrolídeos e iii) um mecanismo de expulsar os macrolídeos da bactéria. Esta classe de antibióticos é muito empregada contra as bactérias Gram positivas e atuam bloqueando a síntese proteica ao se ligarem à fração 50 S dos ribossomos; desta forma, devido a alta resistência do *S. aureus* frente a diversos antibióticos, estes seriam rapidamente ineficazes para o controle da dermatite atópica.

Noble (1996, p. 13) observou que associação de ácido linoléico/ linolênico inibia o crescimento de *S. aureus* em concentrações 10 vezes menores que as necessárias para impedir o crescimento de staphylococci coagulase negativos da microbiota de pele. No entanto, essa formulação não atua na cura da dermatite.

Mesmo assim, deve-se ressaltar a procura por terapias que não causem resistência e sejam seletivas para o patógeno em questão.

Schempp et al. (2003, p. 36) testaram a eficácia de um creme contendo extrato de *Hypericum perforatum* L.. Os resultados encontrados foram satisfatórios, mas os autores julgaram importante conduzir outro estudo realizando uma comparação com a ação de corticóides.

Cork (1996, p. 36) comenta da importância do antibiótico utilizado contra *S. aureus* ter baixo potencial de sensibilidade, ou seja, a bactéria ficar resistente à concentração utilizada na terapia e ser necessário administrar doses cada vez maiores para se obter a mesma eficácia. Isso é observado para o antibiótico neomicina, aplicado em infecções bacterianas.

Ellis et al. (2003) estudaram o efeito e o custo de uma preparação tópica contendo tacrolimus e obtiveram respostas satisfatórias em adultos. No entanto, tal fármaco é um imunossupressor e, dessa forma, não atua diretamente na cura desta disfunção. Além disso, essa terapia medicamentosa possui custo elevado.

A antibiótico terapia sistêmica apresenta um relevante inconveniente. Estudos farmacocinéticos demonstram a necessidade de altos níveis séricos do fármaco para que ele esteja na sua forma livre para exercer ação, o que significa que o medicamento chegará no local de ação em quantidade suficiente apenas no estágio de alta circulação sanguínea. Dessa forma, neste caso é mais aconselhável optar por um tratamento tópico (TRASCRIPT, 1996, p. 41).

Cerio (1997, p. 9) resalta os cuidados que se deve ter com a hidratação da pele dos pacientes com dermatite atópica e a exacerbação da doença como uso contínuo do corticóides, que apenas tratam dos sintomas da patologia e não atuam na sua cura.

Masako et al. (2005a, p. 200 e 2005b) estudaram a associação do antibiótico farnesol e do xilitol, produto alvo deste estudo, no controle da dermatite atópica. O grupo observou que o xilitol, ao impedir a formação de glicocálix e conseqüentemente do biofilme, atua ajudando nessa hidratação. No entanto, não foi elucidado o mecanismo de ação do xilitol nesta situação, bem como não foram observadas situações nas quais este composto seria o único princípio ativo de uma formulação.

Como o xilitol provavelmente atua nas propriedades do meio, ao não ser fermentado pela bactéria ou devido a características osmóticas por ser um poliálcool,

e também na aderência da bactéria ao tecido, esse biofármaco possui grande potencial para atuar nesse controle. Além disso, não foram encontrados casos de resistência ou de reações adversas em relação ao xilitol em toda a literatura pesquisada.

2.3 MICROBIOLOGIA DA BACTÉRIA *Staphylococcus aureus*

A bactéria *Staphylococcus aureus* pertence ao gênero *Staphylococcus* que compreende cocos Gram positivos com arranjos irregulares, com metabolismo tipicamente aeróbio e produtores da enzima catalase. Essas características são comuns aos microrganismos do gênero *Micrococcus* e o teste oxidação/fermentação (O/ F) é executado para diferenciá-los; *Micrococcus* produzem ácidos apenas em condições de aerobiose (no topo do tubo de ensaio) enquanto *Staphylococcus* produzem ácido também em condições de anaerobiose. Esse ácido produzido reage com o meio em que o microrganismo está crescendo (MANDIGAN; MARTINKO; PARKER, 2002). A morfologia da bactéria *S. aureus* pode ser visualizada na figura 2.

Figura 2. *Staphylococcus aureus*. Cocos Gram positivos, agrupados em cachos
Fonte: Geocities, 2007a

Staphylococcus são tolerantes a altas concentrações salinas, como 7,5 % de cloreto de sódio, o que é interessante para o seu isolamento, e geralmente são pigmentados. *S. aureus* é a espécie de maior destaque do gênero, por estar mais relacionado a doenças e contaminações, e forma colônias de cor amarela, em ágar sangue, conforme pode ser observado na figura 3.

Figura 3. Colônias de *S. aureus* em ágar sangue
Fonte: The Sanger Institute, 2005

S. aureus está associado a impetigos, furúnculos, dermatite atópica, pneumonia, osteomielite, cardidites, meningites e artrites. Essa espécie produz diversas hemolisinas (enzimas extracelulares associadas à hemólise, que pode ser visualizada em placas de ágar sangue cultivadas com esse microrganismo), enterotoxinas (toxinas encontradas em alimentos contaminados), coagulases (enzimas responsáveis pela formação de coágulo de fibrina, o qual leva à formação de biofilme, fator que aumenta a virulência da bactéria), leucocidinas (destroem os linfócitos, importantes células de defesa do sistema imunológico). Algumas cepas são ainda as causadoras da Síndrome do Choque Tóxico, que se caracteriza por febre alta, *rash* cutâneo, vômitos, diarreias e às vezes até morte. A toxina relacionada a essa síndrome é um superantígeno o qual desencadeia uma resposta inflamatória no organismo, com a presença de linfócitos T. A enterotoxina A presente em alimentos contaminados também é um superantígeno. Uma terapia antibiótica para infecções causadas por *S. aureus* é um problema devido à resistência a diversos fármacos encontrados no mercado. Recomenda-se realizar o teste de sensibilidade antimicrobiana antes de iniciar o tratamento (MANDINGAN; MARTINKO; PARKER, 2002). Segundo Capoluongo et al. (2001, p. 152), *S. aureus* é um microrganismo com uma enorme variabilidade genética.

Existem mais de 30 espécies e subespécies de staphylococci, e talvez a única patológica com interesse dermatológico seja a espécie *S. aureus*, que é coagulase positiva. Membros da flora bacteriana presente na pele, coagulase negativos, como *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus hominis*, são encontrados em ferimentos (NOBLE, 1996, p. 12). Este microrganismo é também o causador mais

freqüente de conjuntivites e blefarconjuntivites bacterianas agudas e crônicas (WILSON, 1980 apud YOUNGMAN, 1995, p. 219).

A capacidade aderente de *S. aureus* se relaciona à dermatite atópica. Cho et al. (2001, p. 216) observaram que o primeiro evento da colonização do tecido por *S. aureus* requer a adesão da bactéria ao tecido. O ressecamento e as fissuras da pele não aparentam ser as únicas razões para o aumento da quantidade desta bactéria na dermatite atópica. O aumento da adesão de *S. aureus* a células epiteliais pode envolver a adesão de componentes da fibronectina (CORK, 1996, p. 33).

Neste estudo foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a qual, segundo o *American Type Culture Collection* (ATCC), é utilizada em testes de suscetibilidade de uma série de antibióticos e como microrganismo de referência para atividades relacionadas ao controle da qualidade, além de outros empregos (ATCC, 2007).

2.4 NOVAS TENDÊNCIAS NO CONTROLE DE INFECÇÕES BACTERIANAS

Nos últimos anos um alarmante aumento da resistência das bactérias patogênicas aos antibióticos intensifica a busca por soluções novas de combate a estes microrganismos. Uma opção bastante promissora é a de impedir a aderência da bactéria aos tecidos, ou de expulsá-la do mesmo nos primeiros estágios do contato; para isso, possíveis agentes seriam os carboidratos. Do ponto de vista médico, esta intervenção molecular é bastante segura comparada com as quimioterapias disponíveis. Sacarídeos são ideais para este propósito uma vez que estes provavelmente não são tóxicos nem imunogênicos e são constituintes normais da superfície das células. Além disso, como não são bactericidas, (não impedem que a célula se divida), a seleção de cepas resistentes é um fenômeno de baixa ocorrência (SHARON; OFEK, 2000). A capacidade dos carboidratos de impedir o crescimento microbiano bloqueando a aderência da célula a uma superfície pode ser testada amplamente, uma vez que a cápsula, provavelmente, não participa do mecanismo de aderência, pois sabe-se que fracas e

fortes adesões são encontradas com diversos tipos de cápsulas (ANDERSSON et al., 1981, p. 316). Uma alternativa é baseada no conhecimento de que a adesão do microrganismo a superfície do hospedeiro é a primeira etapa para uma série de infecções. Dessa forma, uma interferência na adesão pode prevenir infecções e resultar em cura (OFEK; KAHANE; SHARON, 1996, p. 297).

A maioria das infecções é causada inicialmente pela adesão do patógeno ao tecido, e esta é mediada por lectinas (proteínas presentes em membranas bacterianas, geralmente glicosiladas, com 10-14 resíduos de monossacarídeos) presentes no microrganismo que se une de maneira complementar a glicoproteínas ou glicolipídeos do tecido a ser infectado (SHARON; OFEK, 2000). A adesão das células a superfícies possibilita um melhor acesso às fontes nutritivas, facilitam o contato de toxinas com as células do hospedeiro e uma eventual penetração (ACORD; MASKELL; SEFTON, 2005, p. 55).

Na literatura são encontrados relatos de anti-aderência microbiana relacionados à ação de polissacarídeos. Belluco et al. (2001, p. 220), em experimentos controlados com coelhos, constataram que um gel contendo uma substância derivada do ácido hialurônico impediu a aderência de microrganismos em regiões abdominais após cirurgias. A concentração de 4 % foi a qual se observou o maior número de animais livre de microrganismos na área em estudo (90 %), mas em concentrações de 1 % já foi observada ação. Apesar de o xilitol ser empregado no controle da otite média aguda em virtude de sua propriedade de impedir a aderência das bactérias *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* em graus variados (KONTIOKARI; UHARI; KOSKELA, 1998), um polissacarídeo (3'-silalolacto-N-neotetraose) testado por Ukkonen et al. (2000, p. 1401) não foi eficaz no controle desta aderência em um estudo randomizado, duplo-cego, com uso de placebo (solução fisiológica), fase II dos ensaios clínicos. Isto reforça a real necessidade de testar os mecanismos de anti-aderência em organismos vivos para se certificar desta ação. Em relação ao xilitol, há trabalhos publicados que explicam sua ação contra os microrganismos por um provável mecanismo relacionado à aderência, apesar de não ser elucidado como este atua. Lengsfeld, Faller e Hensel (2007, p. 122), relataram o fracasso do teste de um polissacarídeo extraído de *Abelmouschus esculentus* L., o qual, apesar de inibir a aderência da bactéria *Helicobacter pylori in vitro*, com resultados animadores, a mesma ação não foi encontrada em experimentos controlados com galinhas. Uma

possível explicação dos autores é que tais compostos, quando administrados por via oral, são metabolizados e atingem seu sítio ativo biotransformado, provavelmente em um composto inativo. Dessa forma, são necessários muitos estudos para conseguir uma molécula que seja absorvida, distribuída e que seja bioativa no seu sítio de ação.

Este trabalho está inserido nesta busca por biofármacos com constituição glicídica, que apresentem mecanismo de ação elucidado *in vitro*, e a partir daí se possa disponibilizar uma formulação terapêutica com alto valor agregado e que seja de fácil acesso para a população. As informações obtidas da literatura consultada demonstram que se trata de um campo de pesquisa científica de grande importância e que há necessidades de grandes descobertas.

2.5 XILITOL: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E TOXICIDADE

A estrutura química do xilitol é caracterizada por uma sequência treó-, treó de grupos hidroxila (-OH). Esta configuração é também observada no D-glucitol e pode ser a responsável pela formação de complexos estáveis com íons, como por exemplo, o cálcio (MAKINEN, 2000, p. 604).

O xilitol é um poli-álcool de cinco átomos de carbono que possui poder edulcorante similar ao da sacarose. Glaser et al. (2000, p. 377), em experimentos com porcos, testaram várias substâncias com poder edulcorante e o xilitol foi tão bem aceito quanto a sacarose, que era o composto de referência. Devido ao seu metabolismo insulino-independente, bem como as suas propriedades não e anti-cariogênicas, este é largamente utilizado como adoçante pela indústria alimentícia em produtos para dietas com restrições de açúcares; seu calor de dissolução negativo é um aspecto positivo para sua incorporação em gomas de mascar e pastilhas (AGUIAR; OETTERER; MENEZES, 1999; SILVA et al., 1993/ 1994). Devido à ausência de grupo aldeídico ou cetônico, este composto não sofre reação de *Maillard*, o que significa que produtos que o contenham não serão escurecidos ao reagir com proteínas sob aquecimento, o que pode limitar, por outro lado, seu uso em produtos nos quais o resultado dessa reação é importante para características visuais (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973; BÄR, 1991). Na figura 4 estão representadas as fórmulas estrutural conforme projeção de Fischer e o arranjo

espacial do xilitol em três dimensões. Outras propriedades físico-químicas do xilitol são apresentadas na tabela 1.

Figura 4. Fórmula estrutural e arranjo espacial do xilitol
Fonte: Biocheminfo, 2005

Quanto à toxicidade e tolerância do xilitol no organismo, Voirol (1977) observou em seus estudos a ausência de sérios efeitos colaterais em indivíduos que utilizaram, por um período de dois anos, o xilitol como único adoçante. A incorporação de xilitol em alimentos é permitida por este ser uma substância atóxica e, portanto, reconhecido como um aditivo do tipo GRAS pelo FDA (*Food and Drug Administration*). A DL_{50} (dose letal média em 50% de uma determinada população) em ratos é de 25,7 g/ kg de peso corporal. De acordo com o *Codex Alimentarius*, o xilitol é um adoçante permitido para ser utilizado na dieta por diabéticos (AGUIAR; OETTERER; MENEZES, 1999). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), testes de toxicidade aguda, nos quais o xilitol foi administrado por via oral, executados em animais indicaram que este composto apresentou toxicidade muito baixa. Testes convencionais de teratogenicidade e embriotoxicidade obtiveram resultados negativos, bem como os testes *in vitro* e *in vivo* para a mutagenicidade e clastogenicidade (WHO/ FAO, 1977). Em 1996, a JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*), uma instituição americana ligada a OMS e a FAO (*Food and Agricultural Organization*), baseada em estudos prévios de categorização em função do estabelecimento do valor de Ingestão Diária Aceitável ($ADI = \text{Acceptable Daily Intake}$), incluiu o xilitol na categoria mais segura na qual um aditivo alimentício pode ser enquadrado (CCC, 2005). Além disso, o xilitol é mais inerte quimicamente do que

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do xilitol

Propriedades	
Fórmula	C ₅ H ₁₀ O ₅
Massa molar	152,15 g/ mol
Aparência	crystal branco
Odor	inodoro
Rotação específica	não desvia a luz plano polarizada
Faixa de fusão	92 – 96 °C
Ponto de ebulição	216 °C (760 mm Hg)
Solubilidade a 20 °C	63 g/ 100 g de solução aquosa
pH em água (100 g/ L)	5 – 7
Densidade de solução	10 %, 1,03 g/ mL; 1,23 g/ mL
Viscosidade (20 °C)	10 %, 1,23 cP; 60 %, 20,63 cP
Calor de dissolução	- 34,8 cal/ g
Calor de combustão	16,69 kJ/ g
Índice de refração (25 °C)	10 %, 1,3471; 50 %, 1,4132
Absorção de umidade (4 dias, temp. ambiente)	60 % UR, 0,051 %
Dulçor relativo	igual a sacarose; maior que manitol e sorbitol
Estabilidade	estável a 120 °C, não carameliza

Fonte: BÄR, 1991, p. 350

a sacarose, o que possibilita aos produtos que contenham xilitol um maior tempo de prateleira (BÄR, 1991). O uso de xilitol está liberado/ aprovado em mais de 50 países do mundo, incluindo membros da União Européia, Suíça, países do Leste Europeu, Brasil, Argentina, Austrália, Japão, Coreia do Sul e China. A aprovação estende o uso do xilitol para todas as categorias de alimentos, produtos dietéticos, farmacêuticos, de higiene oral e cosméticos (KRÜGER, 2005). No Brasil, o xilitol foi aprovado como produto dietético pela DIMED–Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Medicamentos do Ministério da Saúde, conforme processo nº 4624/ 79, comunicado nº 730/ 80, de 7 de julho de 1980 (AGUIAR; OETTERER; MENEZES, 1999). 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). Baseado em estudos *in vivo*, Karimzadegan, Clifford e Hill (1979, apud BÄR, 1991) estipularam o valor calórico de

KARIMZADEGAN, E.; CLIFFORD, A. J.; HILL, F. W. A rat bioassay for measuring the comparative availability of carbohydrates and its application to legume foods, pure carbohydrates and polyols. *Journal of Nutrition*, v. 109, p. 2247-2259, 1979.

2,8–2,9 kcal/ g para o xilitol. Este valor indica que o xilitol possui cerca de 60% de efetividade em relação à glicose em promover o crescimento.

Segundo Bär (1991, p. 355), em relação à utilização de xilitol, pode-se relacionar duas vias metabólicas à princípio: o metabolismo direto ou absorção pelo organismo, principalmente no fígado e a fermentação do xilitol não absorvido pela flora intestinal.

2.6 XILITOL: PRODUÇÃO

Atualmente o xilitol é produzido por processo químico por meio de redução catalítica da xilose purificada em presença do catalisador Níquel de Raney (MELAJA; HÄMÄLÄINEN, 1977; HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982). Esse processo é de custo extremamente elevado uma vez que ocorre em reatores à elevada pressão e temperatura, além de requerer extensivas etapas de purificação da xilose antes de sua hidrogenação a xilitol. Da mesma forma, segundo Farnos Oy (1988) e Nolleau et al. (1993), neste processo são necessárias várias etapas de purificação final, visando à remoção do catalisador para que xilitol possa ser empregado em produtos alimentícios e farmacêuticos.

O xilitol é encontrado em vegetais, mas em concentrações tão baixas, que torna sua extração como uma forma de obtenção deste composto economicamente inviável (PARAJÓ; DOMINGUÉZ; DOMINGUÉZ, 1998).

Diante das dificuldades relacionadas com o processo químico de obtenção de xilitol, que resulta em elevado preço do produto final, surgiu a necessidade de se desenvolver tecnologias alternativas e mais atraentes de obtenção de xilitol, tornando assim com maior frequência e disponibilidade o uso do xilitol nos países do terceiro mundo (PARAJÓ; DOMINGUÉZ; DOMINGUÉZ, 1998, p. 192).

A tecnologia alternativa ao processo convencional de obtenção de xilitol é a produção por via microbiológica, na qual podem ser utilizadas bactérias, fungos e leveduras (NIGAM; SING, 1995, p. 119). Como relevantes vantagens deste processo podem-se citar a não formação de componentes tóxicos, reduzindo significativamente os custos relacionados com a separação e purificação do produto final, além de o processo ocorrer a baixas temperaturas e pressão, o que diminui os custos e amplia a sua possibilidade de aplicação em vários segmentos industriais e institucionais (NIGAM; SINGH, 1995, p. 118). Além disso, o processo fermentativo

não requer também a purificação inicial da xilose, uma vez que a sua conversão a xilitol ocorre diretamente no próprio hidrolisado hemicelulósico proveniente dos resíduos lignocelulósicos. Em relação ao produto final, o xilitol, quando obtido pela via biotecnológica, não necessita do metal níquel, que apresenta toxicidade comprovada aos seres vivos (OGA, 2003, p. 425). A figura 5 ilustra as tecnologias disponíveis para a produção de xilitol.

No DEBIQ (EEL/ USP) os primeiros estudos de obtenção de xilitol por via fermentativa iniciaram-se em 1985. As pesquisas iniciaram com a seleção da levedura fermentadora da pentose xilose (BARBOSA et al., 1988, p. 248). Nestes estudos foi selecionada a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 como promissora para a produção de xilitol. Os resultados satisfatórios com esta levedura justificam a sua utilização nestes processos fermentativos. Os estudos subsequentes foram então conduzidos com esta levedura visando a determinação de um meio de fermentação de composição simples e de baixo custo, bem como a determinação de alguns parâmetros fermentativos que influenciam esta bioconversão. Como resultados obtidos pelo grupo, citam-se diversos trabalhos, os quais podem ser conferidos nas tabelas 2 e 3.

Figura 5. Tecnologias disponíveis para a produção de xilitol
Fonte: Parajó, Dominguez e Dominguez, 1998, p. 193

Tabela 2 – Resultados relacionados à produção de xilitol pela via biotecnológica, utilizando frascos Erlenmeyer, obtidos por pesquisadores do GMBio

Matéria-prima	Tempo de fermentação (h)	X (g/ L)	So (g/ L)	P (g/ L)	Q _P (g/ L h)	Y _{P/S} (g/ L)	Referência
Palha de trigo	72	0,5	51,69	30,5	0,42	0,59	Canilha (2006)
Bagaço de cana	72	2,5*	65	36,2	0,50	0,59	Cunha (2006)
Bagaço de cana	48	1,6**	43,4	21,0	0,44	0,54	Carvalho et al. (2003)
Bagaço de cana	72	3,0	54,5	34,4	0,75	0,74	Felipe et al. (1997)
Bagaço de cana	48	1,0	50,92	20,59	0,429	0,654	Rodrigues (1999)
Bagaço de cana	64	1,0	81,28	35,55	0,515	0,81	Marton (2002)
Cavaco de eucalipto	72	3,0	60,0	10,0	0,10	0,20	Canettieri et al. (2001)
Palha de arroz	96	3,0	90	58,56	0,61	0,72	Mussatto (2002)
Resíduo de eucalipto	48	3,0	80	50,18	1,04	0,64	Morales (2005)

* células imobilizadas em PVA-criogel. Concentração (g/ L) em volume de reator

** células imobilizadas em alginato de cálcio

Tabela 3 – Resultados relacionados à produção de xilitol pela via biotecnológica, utilizando fermentadores, obtidos por pesquisadores do GMBio

Matéria-prima	Agitação (rpm)	Aeração	Coef. de transf. de oxigênio ($k_L a$) (h^{-1})	Tempo de fermentação (h)	X (g/ L)	So (g/ L)	P (g/ L)	Q_P (g/ L h)	$Y_{P/S}$ (g/ L)	Referência
Palha de trigo	300	0,4 vvm		70	0,5	53,2	28,6	0,41	0,55	Canilha (2006)
Bagaço de cana	400	1,04 vvm	10	84	2,78*	64,7	28,6	0,24	0,49	Cunha (2006)
Bagaço de cana	300	1,0 vvm		120	1,4**	68,8	47,5	0,40	0,81	Carvalho (2005)
Bagaço de cana					0,5	62,1	41,8	0,90	0,70	Silva (1997)
Bagaço de cana	300		22,5	40	0,2	53,6	32,5	0,81	0,77	Morita (1998)
Bagaço de cana			30	132	5,0	88,0	62,0	0,48	0,750	Martinez (2005)
Bagaço de cana		50 mL/ min			***	75	13,0	0,18	0,38	Santos (2005)
Bagaço de cana		20 mL/ min			****	75	38,5	0,32	0,72	Santos (2005)
Cavaco de eucalipto	300	0,6 vvm		72	1,5	60,0	25,4	0,35	0,36	Canettieri (1998)
Palha de arroz	400	0,2 vvm		116	3,0	90,3	37,7	0,32	0,53	Mussatto (2002)

* células imobilizadas em PVA-criogel. Concentração (g/ L) em volume de reator

** células imobilizadas em alginato de cálcio

*** células imobilizadas em vidro poroso

**** células imobilizadas em zeólita

Apesar de crescentes rendimentos, produtividades e concentrações de xilitol atualmente obtidos pela via biotecnológica, estes valores ainda não são suficientes para esta substituir o processo químico utilizado. São necessárias investigações para melhor compreensão do metabolismo da xilose em xilitol, os efeitos da disponibilidade de oxigênio na conversão e a ação sinérgica dos inibidores de crescimento microbiano presentes nos hidrolisados hemicelulósicos. Pesquisas relacionadas à imobilização de células, culturas mistas, tecnologia enzimática e técnicas de engenharia genética são empregadas visando uma melhoria deste processo (FELIPE, 2004, p. 310). Paralelamente ao desenvolvimento destas pesquisas pelo GMBio é oportuno pesquisar novas aplicações terapêuticas para o xilitol, visando o fortalecimento da equipe em áreas prioritárias atualmente.

2.7 XILITOL: PROPRIEDADES ANTI-ADERENTES SOBRE BACTÉRIAS

Várias são as bactérias sobre as quais o xilitol atua impedindo sua aderência ao tecido a ser infectado. Os estudos iniciaram-se com a observação de seu efeito não (SCHEININ et al., 1975; PEPPER; OLINGER, 1988) e anti cariogênico (AGUIRRE –ZERO; ZERO; PROSKIN, 1993). Grunberg, Beskid e Brin (1973, p. 231) relatam que os efeitos do xilitol nesta prevenção são superiores aos de outros polióis, como o sorbitol e o manitol. Essa ação foi observada sobre a bactéria *Streptococcus mutans*, principal agente causador das cáries. O efeito não cariogênico é uma consequência deste microrganismo não fermentar o xilitol, não o utilizando como uma fonte de carbono, além do xilitol não acidificar o pH, o que contribui para o crescimento do *S. mutans*. Mäkinen (2000, p. 608), ao estudar recém-nascidos cujos familiares mascavam goma contendo xilitol, constatou que esse cuidado evitava que os bebês apresentassem cáries, uma vez que aerossóis provenientes da mãe são a via de transmissão mais comum deste microrganismo. Essa ação ocorre porque o xilitol impede a aderência da bactéria nos dentes, diminuindo a contagem de células, o que diminui também a chance de transmissão. O mecanismo de ação do xilitol pode ser explicado pela habilidade das moléculas pentitóis de alterarem a aderência associada a estruturas da superfície dos patógenos. Trahan, Bourgeau e Bretonet (1996, p. 1898) também observaram essa ação anti-aderente do xilitol no controle de cáries, e, segundo “Lon” Jones (2003, p.

172), o xilitol continua atuando como anti-cariogênico até dois anos depois de interrompido o tratamento.

No controle da otite média aguda, Kontiokari, Uhari e Koskela (1998, p. 564) observaram que o xilitol administrado via goma de mascar impede a aderência das bactérias *Streptococcus pneumoniae* e em menor proporção de *Haemophilus influenzae*, principais patógenos relacionados a este caso. Segundo os autores, um possível mecanismo de ação é a barreira ao movimento das lectinas bacterianas. Vernacchio, Vezina e Mitchell (2007, p. 94) executaram um estudo piloto com 120 crianças entre 6 meses e 3 anos de idade, faixa etária mais acometida pela otite média aguda, e observaram que o xilitol é bastante tolerado para ser administrado em maiores quantidades e menos vezes ao longo do dia (5 g, três vezes ao dia, ou 7,5 g, uma vez ao dia). Estes resultados permitem uma terapêutica mais acessível de ser adotada. No entanto, Wright (1998, p. 971) postula que a ação do xilitol no controle da otite média aguda pode ser devida a propriedades osmóticas.

Tapiainen et al. (2004, p. 226) observaram alterações na membrana celular de *Streptococcus pneumoniae* após 2 h de exposição a xilitol 5 e 0,5 %, sem diferenças significativas entre as duas concentrações. Estas alterações na membrana estão envolvidas no controle do crescimento desta bactéria e são responsáveis pelo uso do xilitol na otite média aguda.

Naaber et al. (1996, p. 207-208) em experimentos com células da mucosa intestinal denominadas de Caco-2 observaram que o xilitol impedia a aderência e conseqüente desenvolvimento de *Clostridium difficile* (VPI 10463), uma bactéria altamente virulenta e que é o principal agente presente no processo inflamatório que ocorre na colite pseudomembranosa. Essa inibição foi dose-dependente e os autores desconhecem um mecanismo de ação.

Em estudos conduzidos por Masako et al. (2005a e 2005b) em pacientes que apresentavam dermatite atópica, o xilitol inibiu a formação do glicocálix da bactéria *Staphylococcus aureus* e atuou sinergicamente com o farnesol (3, 7, 11- trimetil- 2, 6, 10 – dodecatrien –1- ol, PM 222,37), um antibiótico, no controle desta patologia. O xilitol agiu, dessa forma, como um importante coadjuvante uma vez que o glicocálix é a principal estrutura responsável pela resistência aos fármacos e a que impede o sistema imunológico de reconhecer as bactérias como estranhas ao organismo. A

dermatite atópica é doença inflamatória da pele na qual este microrganismo está presente em 95 % dos casos e é o causador de uma progressão da patologia.

Lee et al. (2006, p. 1157-1158) observaram que o xilitol na concentração de 0,01 mg/ mL impede a aderência da bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, a qual é normalmente associada à colonização de bolsas periodontais.

Sajjan et al. (2004, p. 1386) estudaram o efeito do xilitol como conservante de pulmões, como esta substância agiria na conservação destes órgãos para serem transplantados. A concentração utilizada foi de 60-80 mg/ mL e foi observada uma inibição de 65 % do crescimento da bactéria *Burkholderia cepacia* complexo (BCC), a qual sua ausência está intimamente relacionada ao sucesso do transplante de pulmões. Foi isolada uma cepa desta bactéria, BC7, que teve seu crescimento inibido nestes órgãos. Foi observada uma inibição entre 67-85 % destas células nos pulmões. No entanto, foram incubadas essas mesmas BC7 isoladas de BCC com xilitol nas mesmas concentrações e após um período de 2 h as colônias foram contadas. Não foram observadas diferenças significativas no número de células viáveis na presença do xilitol e dos controles, indicando que o xilitol não afeta a viabilidade das células BC7, mas sim impede sua aderência o tecido.

Um spray contendo um sal de zinco e xilitol, com atividade antialérgica, anti-histamínica e bactericida foi patenteado e o mecanismo de ação envolvido se relaciona à uma espécie de barreira e inibição de aderência bacteriana (PK HOLDINE B V, 2005).

“Seguro como o leite materno: carboidratos como futuras drogas anti-aderentes para doenças bacterianas”, título do trabalho de Sharon e Ofek (2000) reforça a motivação e a importância do xilitol neste estudo.

2.8 OUTRAS APLICAÇÕES CLÍNICAS DO XILITOL

Juntamente com os efeitos não e anti-cariogênico, a aplicação mais difundida do xilitol é a sua utilização como adoçante em substituição à sacarose por pacientes diabéticos e obesos, uma vez que seu metabolismo independe de insulina e pouco contribui para a formação de tecido adiposo (YLIKAHRI, 1979, p. 168). Este composto é também indicado para pacientes deficientes da enzima glicose-6P-desidrogenase (WANG; van EYS, 1981). Em relação às propriedades não e anti cariogênica do xilitol, segundo Iwata et al. (2003, p. 394), esta substância estimula a

salivação e não é fermentada pela placa bacteriana, o que faz com que o pH não abaixe; esta alteração no meio favoreceria o desenvolvimento das cáries. Além disso, estes pesquisadores observaram que o xilitol inibe a captação e o metabolismo da glicose, mas não inibe o metabolismo da sacarose. No entanto, Wen, Browngardt e Burne (2001, p. 342) concluíram que a inativação do gene *frl* em *Streptococcus mutans* faz com que o xilitol não seja mais transportado pela membrana microbiana e o microrganismo se torna resistente à ação anti cariogênica do xilitol.

O xilitol atua sobre os microrganismos do sistema respiratório, e congestões naso-faríngeas, irritações e inflamações associadas com complicações respiratórias com otite média, sinusite podem ser tratadas e prevenidas com aplicação nasal de xilitol/ xilose em solução salina (SAWAGUCHI et al., 2001). Administração de xilitol em preparações sólidas, como gomas de mascar, pó ou comprimido, ou preparações líquidas podem atuar no tratamento de infecções respiratórias em mamíferos, especialmente otite média aguda em humanos (LEIRAS, 2000). Uhari et al. (1996, p. 1183), em experimento duplo-cego e randômico com cerca de 300 crianças, constatou que a ação do xilitol em controlar a otite média aguda se refere à presença do xilitol, e não a uma função mecânica, como por exemplo a mastigação, ao fazer ensaios com goma de mascar contendo xilitol e sacarose.

Georgieff et al. (1991, p. 255) observaram que, ao ser adicionado xilitol em nutrição parenteral administrada em ratos com queimaduras, não ocorreu a degradação das proteínas como acontecia quando tal solução era preparada com glicose. Baseado neste fato foi patenteada uma nova formulação para nutrição parenteral a qual consiste de solução aquosa, aminoácidos e xilitol para o tratamento de pacientes com estresse severo, injúria ou complicações renais. As principais aplicações desta preparação são reduzir a perda de nitrogênio e acelerar a gliconeogênese (GEORGIEFF, 1990).

Um grupo finlandês coordenado por Mattila et al. (1998a, 1998b e 2005) pesquisou a ação do xilitol em problemas ósseos em ratos de laboratório e obtiveram resultados satisfatórios no aumento da massa óssea nos animais com diabetes induzida (Mattila et al., 1998a, p. 579, 580); foi também observado aumento da densidade óssea em ratas as quais tiveram seus ovários retirados (Mattila et al., 1998b, p. 1812). Em um experimento realizado em curto período de tempo (um mês) utilizando ratos, Mattila, Kangasmaa e Knuutila (2005, p. 550) observaram que ao

administrar xilitol 10 % juntamente com etanol 10 %, foram obtidas melhorias maiores na reabsorção óssea e na densidade trabecular do que o xilitol administrado sozinho. Knuuttila et al. (2000, p. 288) verificaram que o xilitol é benéfico no combate ao envelhecimento cutâneo ao diminuir as reações de glicosilação de colágeno. Tischler et al. (1996, p. 118) constataram em experimentos com ratos que o xilitol pode aumentar a absorção óssea de cálcio, podendo ser útil nas prevenções que envolvam a perda deste íon.

O xilitol já foi testado com resultados satisfatórios formando um éster e transformando princípios ativos em pró-fármacos na forma de monobutiratos sendo os últimos utilizados em β -hemoglobinopatias, anemia falciforme e câncer (POUILLART et al., 1998, p. 105). Paleta et al. (2002, p. 2413) observaram em testes que o xilitol atua como um agente co-emulsificante e que apresenta hemocompatibilidade com as substâncias do sangue.

A fibrose cística - doença que acomete os pulmões - é caracterizada por uma colonização bacteriana e infecção crônica. Vários microrganismos podem estar presentes, mas se destacam as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Conforme observado por Welsh e Zabner (2004) e Zabner et al. (2000, p. 11618), o xilitol administrado em forma de pó e/ ou aerossol possui características osmóticas que o permite atuar no controle e tratamento da fibrose cística, reduzindo a força iônica e desta forma possibilitando a ativação de antimicrobianos endógenos. Durairaj et al. (2007, p. 33) comprovaram que o xilitol é seguro e bem tolerado para ser administrado por nebulização em indivíduos com fibrose cística. Domenico e Lavecchia (2002, p. 28) verificaram que o xilitol a 30% p/p pode estabilizar o sangue evitando que hemácias sofram lise em função dessa mesma propriedade.

Jumaa e Müller (1999, p. 209) observaram nos seus estudos que o xilitol é um agente isotonzante mais apropriado para ser usado em emulsões de lipídeos para terapias de nutrição parenteral quando comparado ao glicerol. Jiménez et al. (1995, p. 93) relatam o uso do xilitol em nutrições parenterais hipocalóricas para pacientes recém operados e Wiese et al. (1995, p. 125) utilizaram o xilitol nos seus experimentos em ratos com isquemia induzida e observaram que o xilitol pode interferir na síntese das bases nitrogenadas e recuperar a dinâmica cardíaca parcialmente perdida devido à isquemia.

Salminen et al. (1985) observaram em ratos e camundongos a adaptação da flora intestinal rapidamente à administração de xilitol, apesar de ocorrer uma redução das bactérias Gram-positivas. Em seres humanos destaca-se a ocorrência de diarreia em uma parte do grupo estudado, além de diminuição imediata da porcentagem de leveduras, redução do percentual de bactérias Gram-negativas após 6-10 h e conseqüente aumento da porcentagem de bactérias Gram-positivas.

Munita et al. (2000) patenteou uma formulação terapêutica para uso tópico cujo princípio ativo é o xilitol e que é ativa contra leveduras do gênero *Candida*, especialmente *Candida albicans*.

Segundo Sanróman et al. (1991), no campo da traumatologia, o xilitol é utilizado para preparar poliésteres ramificados como, por exemplo, o hidroxipropil-xilitol, cujas propriedades mecânicas e termofísicas são semelhantes às das espumas de poliuretano, com as vantagens de serem menos deformáveis e não absorverem água como os materiais utilizados convencionalmente para a imobilização de lesões traumáticas.

Amaechi, Higham e Edgar (1998, p. 160) demonstraram em um experimento *in vitro* que a erosão na superfície dos dentes provocada pelo consumo de bebidas ácidas, como o suco de laranja, pode ser minimizada devido ao efeito aditivo do xilitol e do flúor. O xilitol forma um complexo com os íons cálcio, reduzindo, dessa forma, a difusão destes íons e do grupamento fosfato da lesão para a solução.

Ackermann et al. (2004, p. 204) observaram que a administração de uma solução salina contendo xilitol como agente osmótico reprime a expressão do RNA-m dos mediadores do sistema imunológico, chamadas de interleucinas (IL-8) e defensinas (SBD-1 e SBD-2), em pulmões de ovelhas infectadas por *Mannheimia haemolytica*.

O xilitol é utilizado, juntamente com extrato de *Pleurotus comucopiae*, como princípio ativo em uma preparação bastante segura, como um novo agente hipotensivo, ao inibir a enzima coversora de angiotensinogênio (ECA) (THREE B CO LTDA, 2005).

Uma composição antipirética para administração pela via oral ou outra via, contendo um composto antipirético (2 a 100 mg) e xilitol (0,5 a 15 g) foi patenteada (ROQUETTE FRERES, 2005). A função do xilitol é ajudar na manutenção da temperatura do organismo após a diminuição da mesma, ação do antipirético. O xilitol também tem seu uso patenteado no controle da febre em mamíferos não

humanos, como filhotes de ovelhas. O xilitol é administrado pela via nasal, em spray (J. JERRY, 2005).

Em relação à parte dermatológica, a Shiseido Co Ltda (2002) patenteou uma preparação tópica contendo xilitol, arginina, trimetil-glicina e essência de *Ginkgo biloba* para diversos efeitos benéficos, principalmente em peles sensíveis. Uma outra formulação, cuja composição é 80-99,5 % de xilitol e 0,5-20 %, em peso, de um material ácido em pó, facilita o tratamento da sialorréia. O tratamento pode ser feito anidro (TAMA BIOCHEMICAL CO LTD, 2001). Açúcares álcool cuja solução tenha entalpia positiva e que são GRAS para cosméticos e aplicações farmacêuticas, dentre os quais o xilitol é o preferido, são largamente usados em preparações tópicas com propriedades adequadas (BEIERSDORF AG, 1999).

Uma composição contendo xilitol pode ser usada no tratamento de vaginoses. Este poliol é seguro e de custo acessível, e atua seletivamente sobre a bactéria patogênica *Gardnerella vaginalis*, não inibindo o crescimento do *Lactobacillus acidophilus*, a bactéria predominante da flora vaginal (KIMBERLY CLARK CO, 2006a). Além deste microrganismo, o xilitol possui ação contra espécies do gênero *Candida* e *Trichomonas* (KIMBERLY CLARK CO, 2006b).

No campo da nutrição, há um alimento funcional patentado cuja função é melhorar a função hepática, constituído de xilitol e mais três ingredientes. Resultados experimentais mostraram que este alimento possui bons efeitos nos índices das enzimas hepáticas, e pode ser empregado para deficiências deste órgão (YOU XIN, 1999).

Em preparações oftálmicas, polióis como xilitol sorbitol, manitol e inositol, ou combinações destes, podem ser utilizados para diminuir a pressão intraocular e podem ser de aplicação tópica ou em solução (BASOTHERM GMBH, 1994). O xilitol é o agente osmótico de preparação terapêutica contendo um antimicrobiano para a área dos olhos (MERCK SHARP & DOHME, 1993) e Franz, Kompa e Rozman (1996) patentearam uma solução para uso tópico contendo xilitol com propriedade de diminuir a pressão intra-ocular.

2.9 ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Os animais são utilizados em pesquisas científicas com base em princípios evolucionistas. Foi Charles Darwin nos livros “A Origem das Espécies” e “A

Expressão das Emoções no Homem e nos Animais”, no final do século XIX, que evidenciou a ligação evolutiva entre todas as espécies animais. Esta relação estabelecida permite a extrapolação dos dados obtidos experimentalmente em animais para os seres humanos. Regulamentando a utilização de animais de laboratório em experimentos, há uma série de leis que visam minimizar o sofrimento destes e os Comitês de Ética em Experimentação Animal (CEEA) atuam de modo a assegurar o cumprimento das legislações. No Brasil, ainda há poucas leis com este propósito, mas o crescente número de CEEAs garante a permanente discussão do assunto e impede que ocorram abusos e desrespeito para com a vida animal (NETTO, 2006, p. 46).

As espécies animais mais utilizadas são os roedores camundongos, ratos, hamsters e cobaias, e os lagomorfos coelhos, devido principalmente ao baixo custo de manutenção e fácil manejo (NETTO, 2006, p. 46).

As cobaias (*Cavia porcellus*) são animais que medem de 200 a 400 mm, não apresentam cauda e podem pesar de 500 a 1500 g, conforme pode ser visualizado na figura 10. Espécies domesticadas podem apresentar a pelagem lisa e curta, lisa e longa ou grossa e curta. Estes animais têm pernas pequenas, três dedos nas patas anteriores e quatro nas posteriores, todos com garras afiadas. São diurnos e terrestres. Alimentam-se de diversos tipos de vegetais. Vivem em grupos de 5 a 10 animais e habitam pastos, florestas, pântanos e áreas rochosas. Tanto os machos quanto as fêmeas apresentam hierarquia social. Animais cativos podem viver até 8 anos. Sua vocalização inclui “guinchos” de excitação, de ansiedade e ranger de dentes quando ameaçadas. Há registros na literatura de que estes animais foram utilizados por Lavoisier, em 1780, para medir a produção de calor metabólico. Para a execução de experimentos em laboratório, deve-se observar que as cobaias não sintetizam a vitamina C, sendo necessária a administração diária dessa vitamina para prevenir o aparecimento de escorbuto. São dóceis e sensíveis ao estresse, por isso devem ser manipuladas com habilidade e cautela. As gaiolas devem ser limpas diariamente, pois também são suscetíveis a infecções (NETTO, 2006, p. 50).

Figura 10. Cobaia albina, raça *Durkin-Hartley*

Os coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) (figura 11) são animais noturnos, e se alimentam de grama e outras plantas. Vivem em grupos, são coloniais e territoriais e apresentam hierarquia social. São criados como animais de estimação, representam importante fonte de alimento para os seres humanos e sua pele é usada na indústria de vestuário. Pesam entre 4 a 6 kg, quando adultos, e as fêmeas são um pouco mais pesadas que os machos. Apresentam cores variadas. Esses animais apresentam uma característica peculiar que é a coprofagia. Alimentam-se de matéria fecal macia que é expelida durante a noite, ou, caso seja expelida durante o dia, poderá ser obtida diretamente do ânus de outros animais. Esses bolos fecais contêm o dobro de proteínas e metade das fibras contidas na matéria fecal dura, devido à presença de bactérias produtoras de vitamina B. O hábito de coprofagia se inicia entre a terceira e a quarta semana de vida dos animais, e, caso esse comportamento seja impedido, os animais poderão morrer nas próximas três semanas. Para a execução de experimentos em laboratório, deve-se observar que os coelhos são animais dóceis e frágeis, e devem ser manipulados o mínimo possível, sempre com muita perícia. Devem ser alojados em gaiolas amplas, onde possam esticar todo o corpo para descansar e também sentarem sobre as patas traseiras. A coluna vertebral é grande e suscetível a sofrer fraturas, caso o animal não seja manipulado com cuidado (NETTO, 2006, p. 51).

Figura 11. Coelhos albinos, raça Nova Zelândia

2.10 ENSAIOS *IN VIVO*

Para que seja lançado um novo medicamento ou para que um fármaco já com comprovada utilidade do mercado seja empregado para outra finalidade são necessários testes preconizados por órgãos de regulamentação como a ANVISA, FDA, CPMP (*Committee for Proprietary Medicinal Products*) para a asseguuração de que tal produto não cause danos à saúde dos indivíduos que serão beneficiados com este novo produto (BRITO, 1994).

Dessa forma, são realizados testes *in vitro* em uma primeira etapa da descoberta da droga a fim de se verificar as primeiras reações que tal substância pode sofrer. Neste tipo de ensaio é imprescindível que todo o material a ser utilizado esteja estéril para evitar interferências e avaliar apenas a ação da substância- teste. Caso este composto passe por todos os testes *in vitro*, obtendo-se os resultados esperados, serão a seguir realizados testes em animais, que compreendem os ensaios pré-clínicos. Estes testes são mais criteriosos e requerem um conhecimento e aprovação do protocolo a ser executado por um Comitê de Ética, previamente à execução dos ensaios (FDA, 2005a e 2005b). Prosseguindo aos ensaios *in vivo*, são executados os testes clínicos em humanos. Segundo o FDA (2005a), quatro fases compõem estes ensaios, sendo elas: i) fase 1, na qual participam em torno de 20-80 voluntários saudáveis e se estuda o metabolismo, a farmacologia e o mecanismo de ação da droga no organismo humano e ajusta-se a dosagem, relacionado-a com a sua eficácia, durando em torno de 1 ano; ii) já a fase 2 envolve centenas de pacientes com a patologia a ser testada e visa determinar efeitos colaterais e a eficácia do novo produto a curto prazo (duração de 2 anos); iii) na fase 3 é

determinado a relação risco-benefício do novo medicamento através da análise da eficácia e da segurança, dados estes obtidos de experimentos envolvendo milhares de pacientes que apresentam a disfunção estudada, sendo necessários em torno de 5 anos para a execução desta fase e iv) a fase 4 é aquela na qual após o novo produto obter resultados promissores em todas as fases é submetido à revisão e aprovação do órgão regulamentador do país em que se deseja ter seu comércio e consumo aprovados. Com o produto no mercado, são estudadas todas as ações decorrentes do seu uso.

Dentro deste contexto, neste estudo foram executados ensaios de toxicidade dérmica com doses repetidas em coelhos albinos adultos de ambos os sexos da raça Nova Zelândia e fototoxicidade em cobaias adultas do sexo masculino da raça *Durkin-Hartley*. Foram escolhidos tais animais uma vez que são eles os recomendados para a execução destes testes (BRASIL, 1996). Estes animais apresentam uma área adequada no dorso para a aplicação de uma quantidade satisfatória das formulações, além de a pele tosada nesta região possuir vascularização suficiente para absorver o produto.

O teste de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas é executado a fim de determinar a capacidade de causar corrosão e/ ou irritação sobre a pele do paciente após aplicações sucessivas do produto (HERA, 2004).

A importância da execução do teste de fototoxicidade consiste em determinar se a preparação teste induz a uma reação cutânea secundária, semelhante a uma queimadura, produzida pelo contato da formulação com a pele, quando exposta à radiações do tipo ultra-violeta. Essa reação pode produzir diferentes manifestações, tais como prurido, edema e eritema (EMEA, 2005).

Dessa forma, a execução dos testes toxicológicos de descritos neste trabalho tem como objetivo adequar os produtos confeccionados às legislações pertinentes e garantir a segurança das formulações, visando detectar possíveis reações adversas que os mesmos poderiam desencadear em humanos caso não fosse realizada esta importante fase em um estudo no desenvolvimento de um novo medicamento. Ressalta-se que não há registros, na literatura consultada, de estudos das propriedades toxicológicas do xilitol quando administrado pela via dérmica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Análise de Alimentos e Águas, Biofarmácia e Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA) da Faculdade de Farmácia e Bioquímica (FFB) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), de acordo com o convênio de Cooperação Científica entre a UFJF e a ex-FAENQUIL (atual EEL/ USP), cujo número de processo é 842/ 98. As análises de microscopia eletrônica de varredura foram executadas nos laboratórios de Microscopia Eletrônica da EEL-USP. Os ensaios que utilizam animais de experimentação foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFJF. Os protocolos de aprovação, cujos números são 16 e 17/ 2006, encontram-se no Anexo C.

3.1 MICRORGANISMO E MEIO DE CONSERVAÇÃO

Foi utilizada a linhagem *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 proveniente da *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, Estados Unidos. As células foram cultivadas em meio de cultivo TSA (*Tryptone Soy Agar*) (acumedia®, Canadá), a 37 °C por 24 h, sendo posteriormente armazenadas a 4 °C. Repiques da cultura foram realizados a intervalos regulares de 15 dias.

3.2 XILITOL

Nos experimentos foram utilizados xilitol produzido pela via química (teor de pureza maior do que 98 %) (Fluka BioChemika, Suíça) e xilitol produzido pela via biotecnológica, a partir de fermentação do hidrolisado da palha de trigo (pureza em torno de 95 %) e que fora obtido conforme descrito em Canilha (2006).

3.3 PREPARO DE MATERIAL

3.3.1 Ensaios microbiológicos

A vidraria utilizada durante as análises foi esterilizada por calor seco (110 °C, 12 h), em estufa modelo Orion® 515 (Fanem, Brasil) e meios de cultivo e soluções em calor úmido (121 °C, 20 min), em autoclave vertical SD – 18 (Phoenix, Brasil).

As cubetas de quartzo utilizadas na avaliação do crescimento celular foram esterilizadas e descontaminadas conforme procedimento descrito. Após seu uso, estas foram submersas em hipoclorito de sódio comercial por 30 min, foram retiradas e lavadas com água corrente em abundância, em seguida foi adicionado detergente pela metade do volume, agitou-se por 15 s, repetiu-se uma vez, lavou-se novamente com água corrente, rinsou-se com água destilada 5 vezes e com álcool 2 vezes.

As lamínulas para microscopia óptica, que foram empregadas como corpo de prova para as leituras em microscopia eletrônica de varredura, receberam os tratamentos descritos a seguir. Inicialmente estas foram visualizadas a olho nu para certificar-se da ausência de impurezas macroscópicas. A seguir, em suporte de papel com o seu tamanho vazado, estas foram visualizadas em microscópio óptico B061 (Olympus, Japão) nos aumentos de 100 X, 500 X e 1000 X. Posteriormente, estas foram limpas manualmente com lenços de papel, submersas em mistura éter/clorofórmio (Vetec, Brasil) 1:1 (v/ v) recém preparada, acondicionadas em tubos Falcon de 50 mL, de forma individualizada e sonicadas em ultrassom USC 1400 (UNIQUE, Brasil) por dois ciclos de 10 min cada, com um intervalo de 10 min. Em seguida foram cuidadosamente removidas pela extremidade com auxílio de pinça e acondicionadas em metades de placas de *Petri* previamente desengorduradas com a mesma solução e secas em estufa regulada a 35 °C. Logo após a secagem as lamínulas foram acondicionadas em envelopes de papel sulfite os quais foram acomodados em placa de *Petri* e esta foi envolvida com papel pardo e esterilizada por calor úmido (121 °C, 20 min).

Todo o material após o uso foi descontaminado em calor úmido (121 °C, 30 min) antes de ser lavado.

3.3.2 Ensaios biológicos

3.3.2.1 Laboratório de alocação dos animais

Foram realizados testes dérmicos e todo o material empregado fora previamente esterilizado.

O laboratório foi dedetizado com Hidrametilone (gel) e as bancadas e gaiolas, não quais os animais ficaram confinados, foram limpas com água e sabão, seguido de álcool 70 % (v/ v). Para a limpeza do chão e das bandejas das gaiolas foi utilizada a formulação veterinária Herbalvet[®], contendo como princípio ativo o cloreto de benzalcônio.

Toda a superfície da região das gaiolas na qual estiveram os coelhos foi coberta com jornal e as gaiolas com as cobaias foram cobertas com maravalha. Jornais e maravalha eram renovados diariamente.

3.3.2.2 Formulações–teste

As formulações teste foram preparadas em torno de dois dias antes do início de cada ensaio. As bases foram adquiridas de farmácias de manipulação da cidade de Juiz de Fora (MG), com a ressalva de serem sem essência. Foram preparadas soluções de xilitol em água ultra-pura (Gehaka, Brasil) na concentração de 60 % (p/ p) (para cada 100 g de solução, 60 g eram de xilitol e 40 g de água). Com cálculos de proporção simples, foram calculadas as massas desta solução necessária para se obter as formulações teste com concentrações de xilitol de 5,0 % (p/ p) e 10,0 % (p/ p). Para o preparo das soluções foi utilizada uma balança analítica modelo HR-200 (AND, Japão) e um agitador magnético com aquecimento Ceramad Midi (Ika[®]Works, Estados Unidos). Para preparar as formulações–teste utilizou-se uma balança semi-analítica BG-4000 (Gehaka, Brasil) e tanto a base quanto a solução contendo xilitol foram pesadas diretamente em *graaal* de plástico. Em seguida às pesagens, as soluções foram incorporadas às bases em movimentos rotatórios e evitando a formação de bolhas, com auxílio de pistilo, por cerca de 10 min. Após, no próprio *graaal*, as formulações preparadas foram deixadas em repouso por 5 h para se certificar da incorporação da solução contendo xilitol. Decorrido este período as formulações teste foram acondicionadas em potes de fundo falso com tampa e batoque e reservadas para as aplicações. Para o ensaio de toxicidade dérmica com doses repetidas, foram preparados 150 g de cada formulação, sendo 100 g para uso nos testes e 50 g para possíveis observações futuras e para o ensaio de fototoxicidade foram preparados 40 g de cada formulação.

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *S. aureus* FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE XILITOL

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pela observação da turbidez do meio de cultura.

3.4.1 Preparo da suspensão bacteriana

Em um tubo de ensaio contendo o meio de cultivo TSA com colônias de *S. aureus* ATCC 25923, após crescimento conforme descrito no item 3.1, foram adicionados 4,0 mL de solução fisiológica estéril e as colônias foram ressuspensas com leve agitação, obtendo-se uma suspensão microbiana.

3.4.2 Padronização da suspensão bacteriana

A suspensão obtida em 3.4.1 foi padronizada utilizando espectrofotômetro UV-Vis Mini 1240 (Shimadzu, Japão) para 25 % T ($\pm 0,2$ %) a 580 nm. Solução fisiológica estéril foi utilizada como o diluente da suspensão e como o branco para a calibração do equipamento.

3.4.3 Diluição seriada da suspensão bacteriana

Com a suspensão padronizada, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} . Alíquotas de 1,0 mL das diluições 10^{-3} a 10^{-7} foram plaqueadas, por técnica de *pour-plate*, em meio PCA (*Plate Count Agar*) (acumedia®, Canadá), em duplicata. Após incubação a 37 °C em estufa para culturas modelo 502 (Fanem, Brasil) por 24 h as colônias foram contadas com auxílio de contador de colônias CP 600 Plus (Phoenix, Brasil) e foi definida a diluição que apresenta entre 10^3 a 10^4 UFC/ mL.

3.4.4 Avaliação da ação bactericida/ bacteriostática do xilitol sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*

A partir da diluição definida foi verificada a ação do xilitol 1,0 % (p/ v), 5,0% (p/ v) e 10,0 % (p/ v) no controle do crescimento da bactéria *S. aureus* ATCC 25923.

Foram utilizados tubos de ensaio contendo 4,0 mL de TSB (*Tryptic Soy Broth*) (Merck, Alemanha) dupla concentração aos quais foram preparados de acordo com o que foi avaliado. No controle positivo, acrescentou-se 1,0 mL da diluição bacteriana pré-definida e no controle negativo, 1,0 mL da solução contendo xilitol a ser testada, e para cada solução testada havia seu respectivo controle negativo. Em cada tubo teste foi acrescentado 1,0 mL da diluição pré-definida da suspensão bacteriana e 1,0 mL da solução de xilitol a ser testada [1,0 % (p/ v), 5,0% (p/ v) e 10,0 % (p/ v)]. Foram preparados também três tubos contendo somente TSB dupla concentração como controle do meio. Todos os tubos foram incubados a 37 °C por 24 h. Ressalta-se que todos os experimentos foram executados em condições assépticas e em triplicata (adaptado de USP, 1985).

3.5 AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE DE ANTI-ADERÊNCIA BACTERIANA DO XILITOL

As etapas descritas neste ensaio estão de acordo com o proposto com An e Friedman (1997) para um experimento cujo objetivo é avaliar a propriedade de anti-aderência bacteriana, de determinado composto, em laboratório. Um fluxograma ilustrando a seqüência das etapas descritas pode ser visualizado no Apêndice A.

3.5.1 Cultivo de *S. aureus*

Inicialmente, a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mantida em TSA foi repicada para meio BP (*Baird-Parker*) (Difco™, Estados Unidos) e incubada por 37° C durante 24 h. A seguir estas colônias foram ressuspensas em solução fisiológica estéril e 200 µL desta suspensão foram transferidos para 5,0 mL de caldo TSB, sendo incubado a 37 °C por 24 h.

3.5.2 Preparo da suspensão bacteriana

Uma alíquota de 1,0 mL da suspensão cultivada em TSB foi diluída em 9,0 mL de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4, em um tubo de ensaio. A densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 600 nm foi determinada utilizando PBS

como branco. A partir deste valor foi calculado o volume de inóculo correspondente à DO de 0,01.

3.5.3 Preparo dos sistemas para incubação

O volume de inóculo calculado em 3.5.2 foi adicionado a tubos Falcon de 50 mL contendo 25 mL de TSB. A estes tubos foi também adicionada uma lamínula de vidro previamente tratada, a qual é o corpo de prova utilizado nas análises no microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para as diferentes concentrações a serem testadas, foi adicionado volume pré-definido de uma solução estoque de xilitol a 50 % (p/ v), preparada utilizando balança analítica e agitador magnético com manta aquecedora Ceramad Midi de modo que as concentrações finais de xilitol no meio fossem de 1,0 % (p/ v), 5,0% (p/ v) e 10,0 % (p/ v). No controle positivo foi adicionado 2,5 mL de uma solução estoque de glicose (Vetec, Brasil) a 50 %. Neste caso, foram preparados dois controles negativo. Um destes consistiu da lamínula tratada, para verificar se o tratamento aplicado fora eficaz para limpar sua superfície e o outro controle negativo foi preparado adicionando uma lamínula tratada ao meio de cultivo, para controlar a assepsia de toda a execução. Estes sistemas foram incubados a 37° C por 48 h em estufa de cultura.

3.5.4 Preparo das lamínulas para a microscopia eletrônica

Decorrido este intervalo de tempo, as lamínulas foram retiradas e acondicionadas em tubos Falcon de 50 mL previamente esterilizados em autoclave, individualmente, enquanto que as suspensões bacterianas contidas nos tubos Falcon de 50 mL foram centrifugadas em centrífuga modelo 5810R (Eppendorf, Alemanha) por 30 min a 4000 g. As lamínulas foram lavadas com 10 mL de PBS pH 7,4 por duas vezes, após se acrescentou 10,0 mL de PBS pH 7,4 e a seguir estas foram sonicadas em ultrassom a 40 KHz $\pm$ 6 KHz de forma individualizada por 2 ciclos de 10 min, com intervalo de 10 min. Após a sonicação as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,4 e a seguir foram fixadas com glutaraldeído 1 % (grau I) (Sigma, Estados Unidos) por 12 h. Após este intervalo, as lamínulas foram lavadas com PBS pH 7,4 duas vezes e desidratadas com etanol (Vetec, Brasil) em concentrações crescentes de 50 % (v/ v), 70 % (v/ v), 80 % (v/ v), 95 % (v/ v) e 100

% (v/ v) com intervalos de 20 min entre cada troca. A seguir, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente, ao redor da chama, em suporte esterilizado e no qual seu centro não fora apoiado. Após, estas foram acondicionadas em envelopes previamente identificados e esterilizados de papel sulfite, estes foram envolvidos em lenços de papel e conservados em dessecador até as leituras no MEV.

3.5.5 Avaliação do crescimento no meio de cultivo

Os *pellets* de *S. aureus* formados após a centrifugação foram lavados duas vezes com 2 mL de PBS pH 7,4 e ressuspensos com 10,0 mL de PBS. Foram plaqueados 100 µL desta suspensão em meio PCA (*Plate Count Agar*) pela técnica de *drop- plate* e as placas foram incubadas a 37° C por 24 h.

3.5.6 Avaliação do número de unidades formadoras de colônias desprendidas das lamínulas

Foram feitas três diluições seriadas com cada sonicado (10^{-1} a 10^{-3}) obtido a partir das lamínulas submersas em PBS. Alíquotas de 1,0 mL das diluições 10^{-2} e 10^{-3} foram plaqueadas em meio com TSA e as placas foram incubadas 37° C por 24 h.

3.5.7 Microscopia eletrônica de varredura

Após completamente secas, as lamínulas foram metalizadas em metalizadora MED 020 (Baltec, Estados Unidos) com 10 nm de ouro e a seguir foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 1450VP (LEO Electron Microscopy Ltd, Inglaterra), no modo de elétrons secundários (adaptado de CHRISTENSEN et al., 1982 e LOCATELLI et al., 2004).

3.6 ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Foram executados testes de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas e de fototoxicidade utilizando animais de laboratório. Foram utilizados coelhos e cobaias, respectivamente.

Os coelhos são os animais recomendados para ensaios de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. Estes são caracterizados como albinos adultos de ambos os sexos, da raça Nova Zelândia, pesando entre 2 a 3 kg, conforme proposto por Brito (1994, p. 90). Foram utilizados três animais de cada sexo, totalizando seis por grupo experimental. Foram avaliadas quatro formulações contendo xilitol nas concentrações de 5,0 % (p/ p) e 10,0 (p/ p), em creme e em gel.

Nos ensaios de fototoxicidade, utilizaram-se cobaias, por serem os animais principalmente recomendados para este tipo de ensaio (MERCIER, 1991, p. 9). Foram utilizadas seis cobaias, todas do sexo masculino, para cada condição experimental. Cinco animais foram utilizados para o teste e o controle positivo, a cumarina 8-metoxipsoraleno (8-MOP), e um animal foi utilizado como controle negativo. Neste caso, foi testado xilitol na concentração de 10,0 % (p/ p), também em creme e em gel.

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura entre 20-30 °C e taxa de umidade relativa do ar entre 30 e 70%, utilizando para isto um desumidificador (Artel, Itália). As condições de temperatura e umidade relativa do ar foram constantemente monitoradas com auxílio de um termohigrômetro. Períodos de claro e escuro obedeceram ciclos de 12 h. O regime alimentar foi o regime clássico de laboratório, com água potável *ad libitum* e ração apropriada. Para as cobaias, a água era acrescida diariamente de Roovit (Labcon, Brasil) um polivitamínico específico para roedores, rico em vitamina C e estes animais ficaram em duplas durante o período da aclimação. Os animais foram previamente aclimatizados no laboratório por um período de no mínimo 48 h antes da execução dos experimentos. Para a realização dos testes, os animais foram tricotomizados no dorso por esta área possuir a sensibilidade necessária para a aplicação de uma quantidade satisfatória das formulações. Para ambos os testes o animal foi preparado poucas horas antes do início dos testes, tendo seus pêlos removidos mecanicamente com auxílio de tesoura, lâminas de barbear, água e sabonete líquido anti-séptico.

3.7 ENSAIOS DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA COM DOSES REPETIDAS DO XILITOL

Na execução do teste de toxicidade dérmica com doses repetidas (BRITO, 1994), doses repetidas do creme e do gel foram aplicadas, a intervalos de 24 h entre uma aplicação e outra, sobre a pele tosada de coelhos albinos adultos e sadios mantidos em gaiolas individuais. Foram avaliadas quatro formulações contendo xilitol.

Os animais, com os pêlos removidos, foram inicialmente pesados em balança tipo L (Filizola, Brasil). A variação de peso apresentada pelos animais foi monitorada e os valores registrados. Quatro sítios de aplicação com área de 6 cm² cada foram escolhidos aleatoriamente, dois dos quais submetidos à abrasão, a qual foi realizada sem provocar danos ou sangramento da pele.

Foram aplicadas doses de 0,5 g do produto-teste no local escolhido para a reação, um submetido à abrasão e outro não. Os sítios adjacentes, um submetido à abrasão e outro não, serviram como controle do ensaio com a aplicação da base do produto testado. Após a aplicação, as áreas foram recobertas por uma compressa de gaze fixada com esparadrapo hipoalergênico e presa com bandagem. A duração da exposição foi de 4 h. Ao final deste tempo, o produto foi retirado da região com água destilada para eliminar resíduos. Foram feitas as leituras quanto a eritema e edema das áreas expostas às formulações-teste e controles, e a seguir os produtos foram reaplicados. Após 24 h, todo o procedimento de aplicação do produto e lavagem foi repetido e assim sucessivamente, durante 10 dias, totalizando 10 aplicações. O peso dos animais foi monitorado com pesagens no início (1º dia), no meio (6º dia) e ao final (11º dia) dos experimentos.

Foram observados sinais de edema e eritema nos animais após 4 h da exposição inicial e após 24 h de cada exposição subsequente, totalizando 11 leituras. A formação de eritemas e escaras, bem como a de edema foi observada diariamente e classificada segundo critérios descritos por Draize (1959) (Anexo A). De acordo com esta mesma classificação foi determinada a segurança das preparações contendo xilitol quanto a este critério.

3.8 ENSAIOS DE FOTOTOXICIDADE DO XILITOL

Neste teste foram utilizados 5 animais como controle positivo e teste e 1 animal como controle negativo, para cada formulação testada. O peso dos animais foi monitorado durante os experimentos; para isto, foram executadas pesagens no início e término dos experimentos. Neste caso, na remoção dos pêlos fora deixada intencionalmente pêlos delimitando quatro quadrados para cada aplicação. Um lado foi escolhido e padronizado para ser aplicada a formulação teste, enquanto que no outro lado foi aplicado 8-MOP, substância sabidamente fotossensibilizante. As formulações foram aplicadas: 1,0 g de cada formulação-teste [xilitol 10 % (p/ p)] foi aplicado em 2 quadrantes adjacentes e 1,0 g de 8-metoxipsoraleno (2mg/ g) nos demais quadrantes, no grupo-teste. No grupo-controle foi aplicada somente a formulação base (creme ou gel, sem o xilitol). Os sítios mais próximos à cabeça do animal, cada um contendo uma formulação distinta, foram protegidos da radiação com bandagem. A cabeça e outras áreas mais sensíveis do animal também foram protegidas da radiação. Decorrida 1 h após a aplicação da formulação, dois sítios de aplicação foram submetidos a uma única exposição a lâmpada UVA de 15 W (Phillips, Dinamarca), a uma distância de 30 cm, durante 15 min. Essa irradiação corresponde a 100 vezes a dose que uma pessoa poderia estar exposta num dia de verão ao meio dia (SANTOS et al., 2001, p. 72; TIPLER, 2000, p. 326). Após 1 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h terminada a exposição à radiação, foram observadas e anotadas as alterações na pele e foi avaliada a fototoxicidade do xilitol nessas preparações. A observação dos sintomas de edema e eritema nos animais foi classificada de acordo com critérios descritos por Draize (Anexo B) e através da avaliação dos resultados as preparações contendo xilitol a 10,0 % (p/ p) foram classificadas quanto a esta característica (adaptado de BRITO, 1994, p. 117; OKUMURA et al., 2005; PINTO; KANEKO; OHARA, 2003, p. 304).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *S. aureus* FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE XILITOL

As figuras 12 e 13 apresentam os resultados provenientes da incubação (37 °C, 24 h) da bactéria *S. aureus* ATCC 25923 em diferentes concentrações de xilitol. Nestes testes realizados, não se observou inibição do crescimento desta bactéria nas concentrações de xilitol de 1,0 %, 5,0 % e 10,0 % (p/ v), tanto no xilitol produzido pela via biotecnológica quanto por via química. Estes resultados indicam que o xilitol não possui ação bacteriostática ou bactericida sobre este microrganismo. Em todos os casos no controle negativo (TSB dupla concentração e solução de xilitol na respectiva concentração teste) não foi observada a turvação do meio e nos tubos com a solução teste observou-se turbidez comparável àquela dos meios dos tubos controle positivo.

Estes ensaios foram realizados com o objetivo de verificar a concentração inibitória mínima do xilitol frente a bactéria *S. aureus*, em função da literatura reportar ação anti-microbiana do xilitol sobre outros microrganismos. Entretanto, de acordo com os resultados, verifica-se que este comportamento não se aplica a esta linhagem de bactéria. De acordo com a literatura consultada, Uhari et al. (1996, p. 1182), em experimentos com crianças que possuíam otite média aguda, observaram que o xilitol administrado via goma de mascar (8,4 g ao dia), reduziu significativamente ($p = 0,045$) o número de *Streptococcus pneumoniae* envolvido nesta infecção. Em outro estudo, Uhari, Tapiainen e Kontiokari (2001, p. 145) observaram um decréscimo de aproximadamente 42 % do número de crianças acometidas pela otite média aguda quando administrado o xilitol (8,4 g por dia). Foi observada uma redução representativa do crescimento da bactéria *S. pneumoniae* quando cultivada em meio de *Brain Heart Infusion* (BHI) na presença de xilitol a 5 %. Quando cultivada na presença de frutose e de frutose e xilitol, esta inibição não fora mais observada. Dessa forma, foi possível reduzir expressivamente o uso dos antimicrobianos empregados nesta terapêutica. Os autores atribuíram estes resultados à ação do xilitol na inibição do crescimento celular.

Figura 12. Tubos de ensaio ilustrando a não inibição do crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 por xilitol produzido pela via química

Figura 13. Tubos de ensaio ilustrando a não inibição do crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 por xilitol produzido pela via biotecnológica

No entanto, devem-se realizar investigações visando elucidar a presença da frutose interferir nesta ação do xilitol. Também em estudos com esta bactéria, ao relacionar densidade óptica e unidades formadoras de colônia, Kontiokari, Uhari e Koskela

(1995, p. 1820 e 1821) observaram uma inibição do crescimento bacteriano em 35 % e 72%, quando cultivada em xilitol 1 e 5 %, respectivamente por 2 h. Aumentando este período de incubação para 6 h, foram observadas inibições de 39 e 51 %. No entanto, quando estas células bacterianas foram incubadas por 24 h, período adotado neste ensaio, não foram observadas diferenças na contagem destas. Em outros trabalhos relacionados, Zabner et al. (2000), ao estudarem a fibrose cística, observaram que o xilitol aplicado por *spray* não aumenta a osmolaridade do meio, e sim a força iônica, e inibe o crescimento bacteriano estimulando a ação de antibióticos naturais. Dessa forma, este composto por si só não influencia no crescimento celular. Entretanto, ao associar o xilitol com o antibiótico farnesol em formulações, Masako et al. (2005b, p. 209), estudaram em humanos os efeitos destas preparações e observaram uma diminuição da contagem inicial de *Staphylococcus aureus* significativa em relação à inicial ($p = 0,0010$) e em relação ao tratamento com o placebo ($p = 0,045$). Em relação ao staphylococci coagulase-negativos, membros na flora normal da pele, o número inicial foi aumentado de 1 para 1,4 log UFC/ mL. Estes resultados reportam uma ação específica da associação farnesol e xilitol para este controle e os autores não mencionam o mecanismo de ação envolvido nestas mudanças.

4.2 AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE DE ANTI-ADERÊNCIA BACTERIANA DO XILITOL

4.2.1 Avaliação do crescimento no meio de cultivo

Em relação ao crescimento bacteriano no meio de cultivo, não foi possível a contagem das células pelo plaqueamento de quantidade determinada dos *pellets*, uma vez que em todas as placas contendo meio de cultivo PCA e 100 μ L da suspensão formou-se uma massa celular, incontável. No controle negativo (somente TSB e lamínula) não foi observado crescimento celular e, visualmente, as amostras controle positivo e teste apresentaram o mesmo crescimento celular.

4.2.2 Avaliação do número de unidades formadoras de colônias desprendidas das lamínulas

Esta etapa do teste de anti-aderência bacteriana evidenciou que o xilitol não impediu a aderência da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a uma superfície, fato não observado quando se utilizou a glicose (controle positivo). Estes resultados indicam menores valores de UFC/ mL encontrados no controle positivo (glicose 5,0 %); as bactérias, aderidas ao corpo de prova, não foram removidas após a sonicação (tabela 4).

Tabela 4 – Valores das UFC/ mL de cada sonicado e suas respectivas diluições

Substância utilizada	Concentração (%)	Diluições			
		10 ⁻²		10 ⁻³	
Controle positivo (glicose)	5,0	29	17	4	2
	1,0	108	98	12	8
Xilitol biotecnológico	5,0	232	244	34	25
	10,0	862	943	180	185
	1,0	44	48	4	10
Xilitol químico	5,0	120	132	29	18
	10,0	441	412	53	36

Na literatura consultada não há registros de ensaios microbiológicos testando e comparando a ação do xilitol pela via biotecnológica e pela via química. Dessa forma, os motivos pelos quais se desprende aproximadamente o dobro de UFCs para cada concentração do xilitol produzido pela via biotecnológica em relação ao produzido pela via química não é totalmente elucidado. Uma sugestão é a presença de interferentes no meio, devido à presença de aproximadamente 5 % de impurezas, as quais poderiam ter um papel de coadjuvante nesta ação. Outros estudos visando identificar estes compostos são relevantes no sentido de que estes podem atuar como auxiliares do xilitol e reduzir ainda mais a aderência da bactéria em estudo a uma superfície de prova.

4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

Em conjunto com esta contagem, as lamínulas foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). As microfotografias obtidas com o auxílio do MEV reforçaram este mecanismo de ação. Foram observadas células em

quantidades significativas no controle positivo, em arranjo de cachos, indicando que os microrganismos ficaram, de fato, aderidos a este suporte, reforçando a menor contagem nos sonicados plaqueados. No entanto, nas amostras incubadas com o xilitol, tanto o produzido pela via química quanto o produzido pela via biotecnológica, não foram visualizadas células bacterianas nas três concentrações utilizadas. As lamínulas foram visualizadas por toda a sua área e conforme apresentado nas figuras 14 a 20 alguns campos de cada uma das lamínulas no aumento de 5000 X. A figura 21 é uma microfotografia da lamínula após o tratamento.

Figura 14. Células de *S. aureus*, cultivadas em TSB contendo glicose 5,0 %, aderidas ao corpo de prova (aumento de 5000 X)

Figura 15. Ausência de células de *S. aureus*, cultivadas em TSB contendo xilitol 1,0 % produzido pela via química (aumento de 5000 X)

Figura 16. Ausência de células de *S. aureus*, cultivadas em TSB contendo xilitol 5,0 % produzido pela via química (aumento de 5000 X)

Figura 17. Ausência de células de *S. aureus*, cultivadas em TSB contendo xilitol 10,0 % produzido pela via química (aumento de 5000 X)

Figura 18. Ausência de células de *S. aureus*, cultivadas em TSB contendo xilitol 1,0 % produzido pela via biotecnológica (aumento de 5000 X)

Figura 19. Ausência de células de *S. aureus*, cultivadas em TSB contendo xilitol 5,0 % produzido pela via biotecnológica (aumento de 5000 X)

Figura 20. Ausência de células de *S. aureus*, cultivadas em TSB contendo xilitol 10,0 % produzido pela via biotecnológica (aumento de 5000 X)

Figura 21. Ausência de partículas com formas e/ ou tamanhos semelhantes a células indicam que o tratamento aplicado ao corpo de prova é adequado

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram encontrados por Sajjan et al. (2004, p. 1386 e 1389), ao observarem que ao incubar xilitol [6-8 % (p/ v)] por 2 h com células de *Burkholderia cepacia*, não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle. Entretanto, em relação às células aderidas, observou-se que o xilitol inibiu entre 67-85 % esta adesão. Diferentemente ao observado neste estudo, no qual a ação do xilitol foi equivalente para as diferentes doses testadas, Naaber et al. (1996, p. 207 e 208), ao trabalharem com cultura de células Caco-2, observaram uma inibição de aderência dose-dependente do xilitol nas concentrações testadas de 1, 5 e 10 % (p/ v). Estes autores desconhecem o mecanismo de ação envolvido nesta interferência da adesão, mas sugerem que o provável mecanismo responsável por esta ação *in vitro* seja o mesmo que ocorra *in vivo*, nas células do intestino. Kontiokari, Uhari e Koskela (1998, p. 564) ao incubarem células epiteliais na presença de xilitol 5 % (p/ v), por 60 min com agitação de 20 rpm, observaram uma redução significativa do número de células viáveis de *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Também trabalhando com o mesmo microrganismo, *S. pneumoniae*, Tapiainen et al. (2004, p. 226 e 227) observaram que após exposição por 2 h ao xilitol a estrutura da parede celular desta bactéria se tornou difusa e menos definida quando comparada ao

controle, cultivado sem xilitol. Foram utilizadas as concentrações de 0,5 % e 5,0 % e não foram observadas diferenças significativas nas duas concentrações testadas. Após a exposição, foi observada uma diferença significativa ($p < 0,01$) do número total de células injuriadas ou autolisadas do controle utilizado no experimento para as células cultivadas na presença de xilitol. No entanto, apesar destas alterações, as bactérias apresentavam-se viáveis ao final dos experimentos. Em outro estudo utilizando *S. pneumoniae*, Tapiainen et al. (2001, p. 168) observaram uma inibição acentuada do crescimento deste microrganismo quando cultivado em meio contendo xilitol 5,0 %. No entanto, ao adicionar frutose neste meio, observa-se uma não inibição deste crescimento. Entretanto, ao se adicionar glicose, galactose ou sacarose, esta inibição não foi observada. Dessa forma, os autores atribuíram este fato ao envolvimento do sistema da fosfotransferase como via metabólica do xilitol por *S. pneumoniae*, no qual um ciclo fútil consumiria a energia proveniente do metabolismo do xilitol e não possibilitaria o crescimento microbiano.

Os efeitos de compostos com propriedades anti-aderentes sobre microrganismos são bastante recentes, e há poucos trabalhos na literatura pertinente abordando aplicações clínicas (SHARON; OFEK, 2000, p. 663). Estabelecer modelos animais para este estudo pode originar testes não sensíveis e/ou não específicos, uma vez que a adesão é característica da interação microrganismo-hospedeiro e varia para cada espécie de acordo com os receptores de membrana. É possível observar até mesmo variação dentro de uma determinada espécie em diferentes fases do desenvolvimento celular (ZOPH; ROTH, 1996, p. 1019 e 1020).

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com aqueles descritos na literatura os quais descrevem outros compostos que não interferem no crescimento celular e atuam impedindo a aderência microbiana. De fato, Burger et al. (2000, p. 299) observaram que 3 linhagens da bactéria *Helicobacter pylori* tiveram sua aderência a células da mucosa e eritrócitos inibida na presença de material proveniente de suco de uva-do-monte (*Vaccinium macrocarpon*) não dialisado em membrana de corte de 12000-15000. Da mesma forma, trabalhando com o mesmo suco, Shmueli et al. (2004, p. 234) observaram que em 83 espécies de *H. pylori*, a aderência a células gástricas para linhagens sensíveis e resistentes a β -lactamases foi inibida em 79 e 81 %, respectivamente. Posteriormente, este mesmo material não dialisado foi testado em outra situação. Weiss et al. (2004, p. 91), em estudo duplo-

cego e ramdômico com 60 pacientes saudáveis testaram os efeitos suplementares de um enxaguatório bucal contendo este preparado. Após seis semanas de aplicação duas vezes ao dia, foi observado a não redução do número de *Streptococcus mutans* viáveis, mas uma redução de células aderidas devido a propriedades de anti-aderência de constituintes da fruta.

4.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA COM DOSES REPETIDAS DO XILITOL

4.3.1 Monitoramento do peso dos animais

As tabelas 5, 6, 7 e 8 apresentam os valores obtidos com as pesagens dos coelhos realizadas no início, meio e término dos experimentos.

Tabela 5 – Monitoramento do peso dos animais durante o ensaio de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. Formulação-teste: xilitol em gel de carbopol a 5,0 % (p/p)

Coelho número	1	2	3	7	8	9
1ª pesagem (kg)	1,50	1,60	1,80	2,25	1,40	2,10
2ª pesagem (kg)	1,80	1,42	1,75	2,38	1,27	1,76
3ª pesagem (kg)	1,75	1,40	1,76	2,42	1,20	1,82

Tabela 6 – Monitoramento do peso dos animais durante o ensaio de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. Formulação-teste: xilitol em gel de carbopol a 10,0 % (p/ p)

Coelho número	4	5	6	10	11	12
1ª pesagem (kg)	1,85	1,80	1,70	2,35	2,75	1,85
2ª pesagem (kg)	1,70	1,96	1,68	2,22	2,42	1,65
3ª pesagem (kg)	1,65	2,10	1,58	2,25	2,40	---

Observação: o animal número 12 faleceu no 10º dia do experimento.

Tabela 7 – Monitoramento do peso dos animais durante o ensaio de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. Formulação-teste: xilitol em creme lanette a 5,0 % (p/ p)

Coelho número	1	2	3	7	8	9
1ª pesagem (kg)	1,30	1,50	2,00	1,90	1,56	1,76
2ª pesagem (kg)	1,28	1,32	1,92	1,82	1,55	1,75
3ª pesagem (kg)	1,44	1,32	2,06	1,94	1,60	1,82

Tabela 8 – Monitoramento do peso dos animais durante o ensaio de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. Formulação-teste: xilitol em creme lanette a 10,0 % (p/ p)

Coelho número	4	5	6	10	11	12
1ª pesagem (kg)	1,80	1,49	1,76	2,00	1,62	2,05
2ª pesagem (kg)	1,82	1,36	1,84	1,90	1,62	1,98
3ª pesagem (kg)	1,94	1,40	1,94	2,02	1,72	2,16

Analisando os dados coletados ($n = 24$), verifica-se que as três distribuições (1ª, 2ª e 3ª pesagens) não apresentaram evidências de não serem normais (valores de p de 0,807; 0,930; 0,997, respectivamente) e estas três distribuições possuem variâncias iguais (valores de p : 0,107; 0,376; 0,495, respectivamente). Dessa forma, após a análise de variância (ANOVA) para testar se o peso dos animais variou durante os experimentos, pode-se afirmar que não há evidências para afirmar que houve alteração de peso (p valor igual a 0,769).

4.3.2 Observação diária das reações de eritema e edema

Em relação aos testes de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas, foi obtido o subtotal A, referente ao aparecimento de eritemas e escaras e o subtotal B, relacionado à presença de edema. Estes valores foram somados, divididos por quatro (eritema e edema em pele íntegra e escarificada) e divididos por 10 (número de aplicações). As figuras 22 e 23 ilustram exemplos de presença e ausência de reações e as tabelas 9 a 24 (Apêndice B) apresentam todos os dados coletados.

4.3.3 Classificação do grau de irritabilidade das formulações contendo xilitol

De acordo com os resultados apresentados nas tabelas 12 a 27 (Apêndice B), obtém-se os valores finais dos somatórios para cada formulação-teste e controle dispostos na tabela 9.

Tabela 9 – Valores finais referentes ao tratamento dos dados obtidos dos testes de toxicidade dérmica aguda do xilitol com doses repetidas

Forma farmacêutica	Formulação	teste/ formulação controle	Valores referentes a eritema	edema	Somató rio	Valor final
Xilitol em creme	5,0 % (p/ p)		0,17	0	0,17	0,004
	10,0 % (p/ p)		0	0	0	0
Controle do creme lanette	para xilitol a 5,0 % (p/ p)		1,02	0,16	1,18	0,03
	para xilitol a 10,0 % (p/ p)		2,71	0	2,71	0,068
Xilitol em gel	5,0 % (p/ p)		3,8	0,49	4,29	0,107
	10,0 % (p/ p)		9,45	0,64	10,09	0,253
Controle do gel de carbopol	para xilitol a 5,0 % (p/ p)		10,16	0,66	10,82	0,270
	para xilitol a 10,0 % (p/ p)		10,97	0,16	11,13	0,278

Figura 22. Leitura do animal número 2 no 4º dia do ensaio de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. (Formulação-teste xilitol 5,0 % em gel, controle gel de carbopol, mostrando eritema leve presente nas quatro regiões avaliadas e ausência de edema)

Figura 23. Leitura do animal número 9 no 1º dia do ensaio de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas. (Formulação-teste xilitol 5,0 % em creme, controle creme lanette, mostrando ausência de eritema e de edema nas quatro regiões avaliadas)

Segundo a classificação proposta por Draize (1959) (Anexo A), todas estas formulações são classificadas como não-irritantes e estes resultados, oriundos de ensaios pré-clínicos, possibilitam a utilização do xilitol pela via dérmica com segurança confirmada. No entanto, o teste da fototoxicidade torna-se importante para se verificar se há a necessidade de cuidados adicionais ao se expor a pele com a formulação aos raios UVA presentes na radiação solar.

Em um estudo retrospectivo realizado por Derelanko, Finegan e Dunn (1993, p. 162) com 224 casos de ensaios de toxicidade dérmica utilizando seis coelhos por grupo experimental, estes autores observaram que ao diminuir este número para cinco, quatro ou três, obtiveram um valor de concordância um pouco menor do que 90 % quando utilizados 5 ou 4 animais e um valor próximo de 70 % quando utilizados somente 3 animais. Dessa forma, a amostra utilizada nestes ensaios (n=6) é satisfatória e permite encontrar um resultado exato. Para uma mesma substância em concentrações diferentes, Craig et al. (2004, p. 221-222) estudaram a toxicidade dérmica aguda, de óleos extraídos das plantas *Juniperus occidentalis* e *Chamaecyparis lawsoniana* nas concentrações de 0,5, 5 e 50 %, em coelhos albinos da raça Nova Zelândia e obtiveram com resultados ausência de toxicidade, exceto para *J. occidentalis* 50 %, caso no qual se observou uma reação de toxicidade positiva. Tais resultados demonstram a pertinência de se testar uma alta concentração para se garantir da segurança daquela correspondente à dose terapêutica.

4.4 ENSAIOS DE FOTOTOXICIDADE DO XILITOL

4.4.1 Monitoramento do peso dos animais

As tabelas 9 e 10 apresentam os valores obtidos do controle do peso no início e no término dos ensaios.

Tabela 10 – Monitoramento do peso dos animais durante o ensaio de fototoxicidade.

Formulação-teste: xilitol em gel de carbopol a 10,0 % (p/ p)

Cobaia número	1	2	3	4	5	6
1 ^a pesagem (g)	360	320	340	340	360	320
2 ^a pesagem (g)	320	340	320	320	300	360

Tabela 11 – Monitoramento do peso dos animais durante o ensaio de fototoxicidade.

Formulação-teste: xilitol em creme lanette a 10,0 % (p/ p)

Cobaia número	7	8	9	10	11
1 ^a pesagem (g)	350	350	340	320	320
2 ^a pesagem (g)	280	320	340	300	360

Analizando os resultados obtidos do monitoramento das cobaias (n= 11), observa-se que estes não são correlacionáveis ao nível de significância de 5 % ($p = 0,095$). Ao se realizar o teste t pareado, observa-se que os pesos dos animais variaram significativamente durante os ensaios ($t = 2,085963$, GL = 20, $p = 0,021$).

4.4.2 Observação diária das reações de eritema e edema

Os resultados obtidos a partir das leituras diárias das reações de eritema e edema são apresentados nas tabelas 28 e 29 (Apêndice C). As figuras 17 e 18 ilustram leituras destas reações.

Figura 24. Ausência de reações fototóxicas. Animal número 5 (controle), 1 h após a irradiação

Figura 25. Presença de eritema e edema. Animal número 1, 24 h após irradiação. Região A: controle do xilitol: ausência de reações; região B: controle do 8-MOP: presença de eritema leve; região C: teste do xilitol: presença de edema leve; região D: presença de eritema e edema leves

4.4.3 Classificação da fototoxicidade das formulações contendo xilitol

Para ambas as formulações, de acordo com os resultados dispostos na tabelas 28 e 29 (Apêndice C), foram considerados os tempos de 1 h–72 h. Para cada animal foi subtraída a soma das regiões correspondentes à área irradiada da área não irradiada, para a formulação contendo xilitol, a formulação contendo o 8–MOP e os controles (somente gel ou creme). Os resultados apresentados neste trabalho foram analisados de acordo com as observações de Mercier (1991) e Brito (1994). Segundo Mercier (1991, p. 13) quando a diferença de valores obtidos subtraindo os valores relativos a eritema e edema de uma área irradiada da respectiva área não irradiada é maior ou igual a 2, a reação é positiva, ou seja, houve fototoxicidade; quando este valor é 0 ou 1, a reação é negativa e nos outros casos são reações duvidosas. De acordo com Brito (1994, p. 120), a partir do resultado individual de cada animal, o conjunto é então analisado, de acordo com a classificação encontrada no Anexo C.

De acordo com a classificação presente no Anexo C, para a formulação xilitol 10 % em gel, os animais de números 1, 2 e 4 apresentaram reação positiva para o xilitol e para o 8–MOP, e reação negativa no controle negativo. Estes valores indicam que o xilitol na preparação em gel, apesar de não apresentar toxicidade cutânea cumulativa, apresenta alta fototoxicidade. Nos respectivos controles da base não foram observadas reações de fototoxicidade.

Já para a formulações em creme, cujos resultados estão dispostos na tabela 29 (Apêndice C), os animais de número 7, 8 e 9 apresentaram reação positiva para a formulação contendo xilitol e para o 8–MOP, os animais de número 7 a 10. O controle, animal ao qual foi aplicada somente a base (creme lanette), apresentou reação negativa. Estes valores mostram que o xilitol possui alta ação fototóxica também em creme como a base, e demonstram ainda que diferentes veículos são responsáveis por diferentes respostas quando em contato com seres vivos.

Em relação às furanocumarinas, classe química a qual pertence o 8–metoxipsoraleno, Gia et al. (2005, p. 811) observaram que os compostos derivados do psoraleno com grupamentos metoxi, hidroxí ou dimetilaminopropoxi inseridos na posição 8, não apresentaram fototoxicidade quando avaliadas em ensaios de fototoxicidade semelhantes aos executados nesta pesquisa. Outros estudos comprovam a validade do 8–MOP como controle positivo para reações fototóxicas.

Santos et al. (2001, p. 73) testaram a fototoxicidade de um filtro solar contendo uma mistura de três filtros orgânicos e do 8-metoxipsoraleno em cobaias após a exposição à radiação UVA por 2 h e foi observado que a mistura de filtros testada provocou nenhuma reação da pele das cobaias após a exposição, e somente o 8-MOP reagiu. Há, ainda, a necessidade de verificar se um determinado composto com propriedade farmacológica é seguro para a aplicação dérmica. Okumura et al. (2005, p. 22 e 23) observaram em experimentos semelhantes com o realizado neste trabalho que, ao testar soluções de acetona contendo cetoprofeno e 8-MOP e radiações UVA e UVB, quando o cetoprofeno é aplicado não há o aparecimento de eritemas e edemas; tais reações se manifestam somente na presença do controle positivo, o 8-metoxipsoraleno. Para a aplicação dérmica do cetoprofeno, portanto, não há necessidade de cuidados especiais. Já Placzek et al. (2004, p. 992), em ensaios *in vitro* utilizando hemácias de indivíduos não fumantes, demonstraram as propriedades fototóxicas da fumaça do tabaco. Os autores relacionam esta propriedade ao envelhecimento precoce, também relacionado ao consumo de cigarros. Este fato indica que a fumaça do tabaco além de injuriar diretamente os pulmões, provocam reações adversas também na pele de pessoas expostas a esta, sendo necessários cuidados específicos visando a proteção da área exposta.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- ❖ O xilitol não possui propriedades bacteriostáticas ou bactericidas *in vitro* sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- ❖ A propriedade de anti-aderência microbiana do xilitol em relação à bactéria *S. aureus* é o provável mecanismo de ação do xilitol frente a esta bactéria;
- ❖ As formulações tópicas contendo xilitol são não irritativas para a pele, conforme observado nos testes de toxicidade aguda com doses repetidas realizados *in vivo* em coelhos albinos da raça Nova Zelândia;
- ❖ Formulações contendo xilitol apresentam uma certa fototoxicidade. Portanto, quando o xilitol for aplicado via dérmica, esta administração deve ser executada com o uso concomitante de um protetor solar;
- ❖ O xilitol, através das comprovadas propriedades (testadas *in vitro*) de anti-aderência bacteriana sobre, e de não influenciar no crescimento da bactéria *S. aureus*, e com a segurança e cuidados a serem observados obtidos a partir dos ensaios *in vivo* (formulação não irritativa, porém fototóxica), provavelmente é uma biomolécula adequada para ser utilizada no tratamento da dermatite atópica.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando a nova abordagem que este trabalho representa, os resultados permitiram abrir novas propostas de trabalho, tais como:

- ✓ Executar os ensaios de atividade antimicrobiana e aderência microbiana para outros microrganismos, cujo controle do crescimento tenha aplicação terapêutica;
- ✓ Executar ensaios de aderência a nível celular e elucidar de forma mais minuciosa este mecanismo de impedir a aderência;
- ✓ Executar ensaios de toxicidade dérmica crônica;
- ✓ Executar ensaios de fototoxicidade com outros tipos de radiação, utilizando lâmpadas UVB e UVC.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M. R.; GALLUP, J. M.; ZABNER, J.; EVANS, R.B.; BROCKUS, C. W.; MEYERHOLZ, D. K.; GRUBOR, B. BROGDEN, K. A. Differential expression of sheep beta-defensin-1 and -2 and interleukin 8 during acute *Mannheimia haemolytica* pneumonia. **Microbial Pathogenesis**, v. 37, p. 21-27, 2004.
- ACORD, J.; MASKELL, J.; SEFTON, A. A rapid microplate method for quantifying inhibition of bacterial adhesion to eukaryotic cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, p. 55-62, 2005.
- ADACHI, Y.; AKAMATSU, H.; HORIO, T. The effect of antibiotics on the production of superantigen from *Staphylococcus aureus* isolated from atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, v. 28, p. 76-83, 2002.
- AGUIAR, C. L.; OETTERER, M.; MENEZES, T. J. B. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. **Boletim da sbCTA**, v. 33, p. 184-193, 1999.
- AGUIRRE -ZERO, O.; ZERO, T. O.; PROSKIN, M. H. Effect of chewing xylitol chewing gum on salivary flow rate and the acidogenic potential of dental plaque. **Caries Research**, v. 27, p. 55-59, 1993.
- AKIYAMA, H.; TADA, J.; TOI, Y.; KANZAKI, H.; ARATA, J. Changes in *Staphylococcus aureus* density and lesion severity after topical application of povidone-iodine in cases of atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, v. 16, p. 23-30, 1997.
- AMAECHI, B. T.; HIGHAM, S. M.; EDGAR, W. M. The influence of xylitol and fluoride on dental erosion *in vitro*. **Archives of Oral Biology**, v. 43, p. 157-161, 1998.
- AN, Y. H.; FRIEDMAN, R. J. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. **Journal of Microbiological Methods**, v. 30, p. 141-152, 1997.
- ANDERSSON, B.; ERIKSSON, B.; FALSEN, E.; FOGH, A.; HANSON, L.A.; NYLEN, O.; PETERSON, H.; EDEN, C. S. Adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal epithelial cells *in vitro*: differences in adhesive capacity among strains isolated from subjects with otitis media, septicemia, or meningitis or from healthy carriers. **Infection and Immunity**, v. 32, p. 311-317, 1981.
- ARNDT, K. A. **Terapêutica em Dermatologia**. Rio de Janeiro/ São Paulo: Atheneu, 1987. 189p.
- AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. **Dermatologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 373p.
- ATCC – *American Type Culture Collection*. Disponível em <<http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=25923>>. Acesso em 16 jan. 2007.

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

BARBOSA, M. F.; MEDEIROS, M. B.; MANCILHA, I. M.; SCHEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 241-251, 1988.

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

BEIERSDORF AG. Gohla Sven; Heinze Friedrich; Nielsen Jens; Thamssen Carl. **Cosmetic and medicinal topical preparations**. US5861440, 19 jan. 1999.

BELLUCO, C.; MEGGIOLARO, F.; PRESSATO, D.; PAVESIO, A.; BIGON, E.; DONÀ, M.; FORLIN, M.; NITTI, D.; LISE, M. Prevention of postsurgical adhesions with na autocrosslinked hyaluronan derivative gel. **Journal of Surgical Research**, v. 100, p. 217-221, 2001.

BIOCHEMINFO. **Xylitol**. Disponível em <<http://www.biocheminfo.org/klotho/html/xylitol.html>>. Acesso em: 30 out 2005.

BRASIL. 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: 07 out. 2005. 12:10:05

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Publica proposta de Norma para estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos (anexos I e II). Estabelece o prazo de 60 (sessenta) dias, a contar da publicação desta Portaria, para que interessados apresentem sugestões, junto à Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 116 de 08 de agosto de 1996**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 07 out. 2005. 12:12:30

BRITO, A.S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1994. 122p.

BULKFOODS. **Baking Ingredients**. Disponível em < <http://www.bulkfoods.com/baking.asp>>. Acesso em: 06 fev. 2007.

BURGER, O.; OFEK, I.; TABAK, M.; WEISS, E. I.; SHARON, N.; NEEMAN, I. A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, p. 295-301, 2000.

CANETTIERI, E. V. **Aproveitamento do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto para produção de xilitol utilizando projeto de experimentos**. 1998. 97p.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), 1998.

CANETTIERI, E. V.; ALMEIDA e SILVA, J. B.; FELIPE, M. G. A. Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnonolgy**, v. 24, p. 159-168, 2001.

CANILHA, L. **Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo**. 2006. 153p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena (SP), 2006.

CAPOLUONGO, E.; GIGLIO A, A; LAVIERI, M. M.; PAROLA, I. L.; FERRARO, C.; CRISTAUDO, A; BELARDI, C. M.; LEONETTI, F.; MASTROIANNI, A.; CAMBIERI, A; AMERIO, P.; AMEGLIO, F. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* stains isolated in subjects with atopic dermatitis. Higher prevalence of exfoliative B toxin production in lesional strains and correlation between the markers of disease intensity and colonization density. **Journal of Dermatological Science**, v. 26, p. 145-155, 2001.

CARVALHO, W. **Estudo da obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana com células imobilizadas em gel de alginato de cálcio**. 2004. 110p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), 2005.

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; SANTOS, J. C.; CONVERTI, A. Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 553-559, 2003.

CCC- Calorie Control Council. **Reduced- calorie sweeteners**: Xylitol. Disponível em < <http://www.caloriecontrol.org/xylitol.html> > . Acesso em: 05 out. 2005.

CERIO, R. Therapy of atopic dermatitis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 8, p. 6-10, 1997.

CORK, M. J. The role of *Staphylococcus aureus* in atopic eczema: treatment strategies. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.7, p. 31-37, 1996.

CHINACHEMNET. **Gold Suppliers**. Disponível em <http://www.chinachemnet.com/en/company/33752/product_en/1011560.html>. Acesso em: 06 fev.2007.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; BISNO, A. L.; BEACHY, E. H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 1, p. 318-326, 1982.

CHO, S.; STRICKLAND, I.; BOGUNIEWICZ, M.; LEUG, D. Y. M. Fibronectin and fibrinogen contribute to the enhanced binding of *Staphylococcus aureus* to atopic skin. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.108, p. 269-274, 2001.

CRAIG, A. M.; KARCHESY, J. J.; BLYTHE, L. L.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, M. P.; SWAN, L. R. Toxicity studies on western juniper oil (*Juniperus occidentalis*) and Port-Orford-cedar oil (*Chamaecyparis lawsoniana*) extracts utilizing local lymph node and acute dermal irritation assays. **Toxicology Letters**, v. 154, p. 217-224, 2004.

CUNHA, M. A. A. **Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico**. 2006. 105p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena (SP), 2006.

DERELANKO, M. J.; FINEGAN, C. E.; DUNN, B. J. Reliability of using fewer rabbits to evaluate dermal irritation potential of industrial chemicals. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 21, p. 159-163, 1993.

DERMENETNZ. **Atopic dermatitis**. Disponível em <<http://dermnetnz.org/dermatitis/atopic.html>>. Acesso em: 05 out 2005.

DOMENICO, R. D.; LAVECCHIA, R. Stabilization of human haemoglobin by naturally occurring osmolytes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 27-30, 2002.

DRAIZE, J. H. Dermal toxicity. The appraisal of chemicals in foods, drugs and cosmetics. **Association of Food and Drug Officials of the United States**, Austin, Texas, p. 46-59, 1959.

DURAIRAJ, L.; LAUNSPACH, J.; WATT, J. L.; MOHAMED, Z.; KLINE, J.; ZABNER, J. Safety assessment of inhaled xylitol in subjects with cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 6, p. 31-34, 2007.

ELLIS, C. N.; DRAKE, L. A.; PRENDERGAST, M. M.; ABRAMOVITS, W.; BOGUNIEWICZ, M.; DANIEL, R.; LEBWOHL, M.; PALLER, A. S.; STEVENS, S. R.; WHITAKER-WORTH, D. L.; TONG, K. B. Cost-effectiveness analysis of tacrolimus ointment versus high-potency topical corticosteroids in adults with moderate to severe atopic dermatitis. **Journal of American Academic Dermatology**, v. 48, n. 4, p. 553-563, 2003.

EMA – The European Agency of the Evaluation of Medicinal Products. **Committee for Proprietary Medicinal Products**: Note for Guidance of Photosafety Testing. Disponível em <<http://www.emea.eu.int/>>. Acesso em: 28 out. 2005.

ERAMIAN, D.; STRICKLAND, L.; DRY, L.; COGHILL, K.; WINNTERS, P.; FISCHER, S.; SCHULZ, D.; CARSTOIU, D. S.; REESE, E.; KEFLEMARIAM, Y.; MASSEY, A.; LITTLEHALES, C.; DEDEO, E. **Editors' and Reporters' Guide- 2004-2005**. Washington: Biotechnology Industry Organization, 2004. 142p.

FAERGEMANN, J. A pilot study on the efficacy of mometasone furoate fatty cream on clinical parameters, time to relapse and microbial flora in atopic dermatitis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 8, p. 217-221, 1997.

FARMOS OY. Ojamo Heikki; Ylinen Lasse; Linko Matti. **Process for the preparation of xylitol from xylose by cultivating *Candida guilliermondii***. WO 8805467, 28 jul. 1988.

FDA (a) – Food and Drug Administration. **Federal Register**. Disponível em <www.fda.gov/cder/guidance/1857fnl.pdf>. Acesso em: 28 out. 2005.

FDA (b) – Food and Drug Administration. **Center for Drug Evaluation and Research**- Frequently asked questions on drug development and investigational. Disponível em <<http://www.fda.gov/cder/about/smallbiz/faq.htm#Phases%20of%20an%20Investigation>>. Acesso em: 28 out. 2005.

FELIPE, M. G. A.. Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Materials. In: SAHA, B. D.; HAYASHI, H. **Lignocelulosic Biodegradation**. New Orleans, American Chemical Society, 2004. p. 300-315.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 251-254, 1997.

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

GAMONAL, A.; DUTRA, F. O. S. Eczemas e dermatitis. In: GAMONAL, A. **Dermatologia Elementar** – Compêndio de Dermatologia. 2ª ed. Juiz de Fora: editado pelo autor, 2002. 305p.

GEOCITIES. **CapeCanaveral**. Disponível em <<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/3504/sagm.jpg>>. Acesso em: 22 jan. 2007.(a)

GEOCITIES. **Frutas Regionais**. Disponível em <<http://www.geocities.com/atine50/frutas/frutas.jpg>>. Acesso em: 06 fev. 2007.

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

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

GIA, O.; MAGNO, M. S.; GONZALEZ-DIAZ, H.; QUEZADA, E.; SANTANA, L.; URIARTE, E.; VIA, L. D. Design, synthesis and photobiological properties of 3,4-cyclopentenepsoralens. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 13, p. 809-817, 2005.

GLASER, D.; WANNER, M.; TINTI, J. M.; NOFRE, C. Gustatory responses of pigs to various natural and artificial compounds known to be sweet in man. **Food Chemistry**, v. 68, p. 375-385, 2000.

GRUNBERG, E.; BESKID, G.; BRIN, M. Xylitol and dental caries. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 43, p. 227-232, 1973.

HERA – Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of Household Cleaning Products. **HERA Risk Assessment of AHTN (6-Acetyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyltetraline)**. Disponível em < <http://www.heraproject.com/Library.cfm> >. Acesso em 28 out 2005.

HIKITA, I.; YOSHIOKA, T.; MIZOGUCHI, T.; TSUKAHARA, K.; TSURU, K.; NAGAI, H.; HIRASAWA, T.; TSURUTA, Y.; SUZUKI, R.; ICHIHASHI, M.; HORIKAWA, T. Characterization of dermatitis arising spontaneously in DS-Nh mice maintained under conventional conditions: another possible model for atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, v. 30, p. 142-153, 2002.

HYVÖNEN, L.; KOIVISTOINEN, P.; VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. **Advances in Food Research**, v. 28, p. 373-403, 1982.

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

J. JERRY. Bozeman Jerry J; Jones Alonzo H. **Nasal administration of xylitol to a non-human mammal**. NZ, NZ532885, 29 set. 2005.

JIMÉZEZ, F. J. J.; LEYBA, C. O.; JIMÉNEZ, L. M. J.; VALDECASAS, M. S. G.; MONTERO, J. G. Study of hypocaloric peripheral parenteral nutrition in postoperative patients (European project). **Clinical Nutrition**, v. 14, p. 88-96, 1995.

JUMAA, M.; MÜLLER, B. W. In vitro investigation of the effect of various isotonic substances in parenteral emulsions on human erythrocytes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, p. 207-212, 1999.

KARIMZADEGAN, E.; CLIFFORD, A. J.; HILL, F. W. A rat bioassay for measuring the comparative availability of carbohydrates and its application to legume foods, pure carbohydrates and polyols. **Journal of Nutrition**, v. 109, p. 2247-2259, 1979.

KIMBERLY CLARK CO. Yang Shu P; Huang Lei. **Compound and method for prevention and/or treatment of vaginal infections**. US2006106117, 18 maio 2006a.

KIMBERLY CLARK CO. Yang Shu-Ping; Huang Lei; Martin Stephanie M ; Villanueva Julie; Greene Sharon; Arehart Kelly; Sayre Curtis ; Johnson Robert B. **Therapeutic agents for inhibiting and/ or treating vaginal infection**. US2006105963, 18 maio 2006b.

KNUUTILA, M. L. E.; KUOKSA, T. H.; SVANBERG, M. J.; MATTILA, P. T.; KARJALAINEN, K.M.; KOLEHMAINEN, E. Effects of dietary xylitol on collagen content and glycosylation in health and diabetic rats. **Life Sciences**, v. 67, p. 283-290, 2000.

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

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

KRÜGER, C. Efeitos refrescantes com xylitol. **Aditivos & Ingredientes**, São Paulo, n. 36, p. 26-27, jan./ fev., 2005.

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

LEIRAS OU. UHARI MATTI; KONTIOKARI TERO. **Use of xylitol and pharmaceutical compositions therefor**. US6066677, 23 maio 2000.

LENGSFELD, C.; FALLER, G.; HENSEL, A. Okra polysaccharides inhibit adhesion of *Campylobacter jejuni* to mucosa isolated from poultry *in vitro* but not *in vivo*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, p. 113-125, 2007.

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

‘LON’ JONES, A. H. The next step in infectious disease: taming bacteria. **Medical Hypotheses**, v. 60, n.2, p. 171-174, 2003.

MÄKINEN, K.K. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? **Medical Hypotheses**, v.54, n.4, p. 603-613, 2000.

MANDIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 9th ed. Prentice Hall: Southern Illinois University Carbondale. 2002. p. 502; 864; 927-929.

MANZ, U., VANNINEN, E., VOIROL, F. Xylitol-its properties and use as a sugar substitute in foods. In: **Food r. a. symp. sugar and sugar replacements**. London, 10 out. 1973.

MARTINEZ, E. A. **Estudo do processo de cristalização de xilitol obtido por via fermentativa**. 2005. 165p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), 2005.

MARTON, J. M. **Avaliação dos diferentes carvões ativados e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para a obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), 2002.

MASAKO, K.; HIDEYUKI, I.; SHIGEYUKI, O.; ZENRO, 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**, v. 38, n. 3, p. 197-205, 2005a.

MASAKO, K.; YUSUKE, K.; HIDEYUKI, I.; ATSUKO, M.; YOSHIKI, M.; KAYOKO, M.; MAKOTO, K. 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**, v. 38, n. 3, p. 207-213, 2005b.

MATTILA, P. T.; KNUUTILA, M. L. E.; SVANBERG, M.J. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism**, v. 47, n. 5, p. 578-583, 1998a.

MATTILA, P. T.; SVANBERG, M. J.; PÖKKÄ, P.; KNUUTILA, M. L. E. Dietary xylitol protects against weakening of bone biomechanical properties in ovariectomized rats. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 10, p. 1811-1814, 1998b.

MATTILA, P. T.; KANGASMAA, H.; KNUUTILA, M. L. E. The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption. **Metabolism**, v. 54, p. 548-551, 2005.

MEDSTAT. **Atopic dermatitis**. Disponível em < http://medstat.med.utah.edu/kw/derm/pages/detr_11.htm >. Acesso em: 05 out 2005.

MELAJA, A. J.; HÄMÄLÄINEN, L. **Process for making xylitol**. US 4008285, 15 fev. 1977.

MERCIER, O. **Test to evaluate the phototoxic and photoallergic potentials by topical applications in the guinea-pig**. Les Oncins: Hazleton France, 1991. 32 p.

MERCK. **The Merck Manual of diagnosis and therapy**. Section 10, Dermatologic disorders, Chapter 111. Dermatitis. Disponível em < http://www.merck.com/mrkshared/mmanual/plates/111pla1_5.jsp >. Acesso em: 05 out. 2005.

MERCK SHARP & DOHME. SHARP LABORATOIRES MERCK; CHIBRET DOHME. **Ophthalmic preparation containing an acceptable antimicrobial osmotic agent**. FR2679773, 05 fev. 1993.

MORALES, M. L. V. **Avaliação do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de resíduos de eucalipto com carvão ativo e resinas de troca iônica, para a produção de xilitol**. 2005. 141p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) –

Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), 2005.

MORITA, T. A. **Estudo da produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: efeito do pH e da aeração**. 1998. 78p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), 1998.

MUNITA, S. L. V.; PEARSON, J.; VIRKKI, M. T.; PEPPER, T.; SAUNDERS, D. Xyrofin Oy. **Uso de polióis, dispositivo apropriado para o tratamento ou profilaxia de infecção da mucosa causada por levedura em mamíferos, processo para tratamento terapêutico ou profilático de mamíferos sofrendo de ou sendo submetidos a um risco aumentado de infecção da mucosa causada por levedura, composição para uso neste tratamento, e, preparação farmacêutica para uso no tratamento profilático ou terapêutico sistêmico ou tópico de infecções na mucosa causadas por levedura**. BR, PI9814721-8A, 03 out. 2000.

MUSSATTO, S. I. **Influência do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na produção de xilitol por *Candida guilliermondii***. 2002. 173p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), 2002.

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

NOBLE, W.C. The role of staphylococci in dermatology. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 7, p.12-14, 1996.

NETTO, S. M. Animais de Laboratório. In : ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia Fundamentos Práticos**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006. p. 46-52

NOLLEAU, V. ; PREZIOSI-BELLOY, L. ; DELGENES, J.P. ; NAVARRO, J.M. Xylitol production from xylose by two yeast strains: Sugar tolerance. **Current Microbiology**, v. 27, p.191-197, 1993.

NIGAM, P.; SINGH, D. Processes for Fermentative Production of xylitol – a Sugar Substitute. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 117-124, 1995.

OFEK, I.; KAHANE, I.; SHARON, N. Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 8, p- 297-299, 1996.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 474p.

OKUMURA, Y.; YAMAUCHI, S.; TAKAYAMA, S.; KATO, H.; KOKUBU, M. Phototoxicity study of a ketoprofen poultice in guinea pigs. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 30, n. 1, p. 19-28, 2005.

PALETA, O.; DLOUHÁ, I.; KAPLÁNEK, R.; KEFURT, K.; KODLCEK, M. Novel amphiphilic fluoroalkylated derivatives of xylitol, D-glucose and D-galactose for medical applications: hemocompatibility and co-emulsifying properties. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 2411-2418, 2002.

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

PEPPER, T.; OLINGER, P. M. Xylitol in sugar-free confections. **Food Technology**, v. 42, p. 98-106, 1988.

PK HOLDINE B V. Peters Albert Franjo. **Pharmaceutical composition in the form of a throat spray, useful for treating allergies, comprises a zinc salt and xylitol**. NL, NL1024714C, 09 maio 2005.

PLACZEK, M.; KERKMANN, U.; BELL, S.; KOEPKE, P.; PRZYBILLA, B. Tobacco smoke is phototoxic. **British Journal of Dermatology**, v. 150, p. 991-993, 2004.

POUILLART, P.; DOUILLET, O.; SCAPPINI, B.; GOZZINI, A.; SANTINI, V.; GROSSI, A.; PAGLIAI, G.; STRIPPOLI, P.; RIGACCI, L.; RONCO, G.; VILLA, P. Regioselective synthesis and biological profiling of butyric and phenylalkylcarboxylic esters derived from D-mannose and xylitol: influence of alkyl chain length on acute toxicity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 93-106, 1998.

POYNER, T. F.; DASS, B. K. Comparative efficacy and tolerability of fusidic acid/ hydrocortisone cream (Fucidin R H cream) and miconazole/ hydrocortisone cream (Daktacort R Cream) in infected eczema. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 7, p. 23- 30, 1996.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325p.

RODRIGUES, R. C. L. B. **Avaliação das condições de concentração a vácuo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para a produção de xilitol**. 1999. 121p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), 1999.

ROQUETTE FRERES. Wills Daniel; Bernard Roselyne. **Antipyretic preparation containing xylitol**. FR, US2006142254, 29 jun. 2006.

SALMINEN, S.; SALMINEN, E.; KOIVISTOINEN, P.; BRIDGES, J.; MARKS, V. Gut microflora interactions with xylitol in the mouse, rat and man. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 23, n. 11, p. 985-990, 1985.

SAJJAN, U.; MOREIRA, J.; LIU, M.; HUMAR, A.; CHAPARRO, C.; FORSTNER, J.; KESHAVJEE, S. A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: inhibition of *Burkholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and

xylitol. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 23, n. 12, p. 1382-1391, 2004.

SANROMÁN, M. A.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; LEMA, J. M. Xylitol: Um alcohol com futuro. **Afinidad**, n. 48, v. 434, p. 215-222, Jul./ Agosto, 1991.

SANTOS, E. P.; GARCIA, S.; FREITAS, Z. M. F.; BARTH, A. L.. Avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares. **Revista Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 71-76, 2001.

SANTOS, J. C. **Processo fermentativo de obtenção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leite fluidizado: avaliação das condições operacionais**. 2004. 159p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), 2005.

SAWAGUCHI MAREYOSHI; SAWAGUCHI YASUKAZU. SAWAGUCHI MAREYOSHI; SAWAGUCHI YASUKAZU; NAKAO KAZURO; KUROMARU HITOSHI; HABA HIROFUMI. **Xylitol nose spray**. JP2001172150, 26 jun. 2001.

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

SCHEININ, A.; MAKINEN, K. K.; TAMMISALO, E.; REKOLA, M. Turku sugar studies XVIII. Incidence of dental caries in relation to 1-year consumption of xylitol chewing gum. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 33, n. 5, p. 268-278, 1975.

SCHEMP, C. M.; WINDECK, T. HEZEL, S.; SIMON, J. C. Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream – a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison. **Phytomedicine**, v. 10, p. 31-37, 2003.

SHISEIDO CO LTD. Maeda Noritoshi; Ogawa Haruo. **Skin care preparation for ameliorating chapped skin**. JP, JP2002121108, 23 abr. 2002.

SHMUELY, H.; BURGER, O.; NEEMAN, I.; YAHAV, J.; SAMRA, Z.; NIV, Y.; SHARON, N.; WEISS, E.; ATHAMNA, A.; TABAK, M.; OFEK, I. Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates to the antiadhesion activity of a high-molecular-weight constituent of cranberry. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 50, p. 231-235, 2004.

SILVA, S. S.; RIBEIRO, J. D.; FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M. Maximizing the xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63/ 65, p. 557-564, 1997.

SILVA, S. S.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A. Xilitol: um adoçante alternativo para a indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 5, p. 109-117, 1993/1994.

TAMA BIOCHEMICAL CO LTD. Katahira Ryota; Komata Kimio; OHORI HISASHI; NAKAMURA KAZUO; MORIYA MASANOBU. **Sialorrhea facilitative composition**. JP, JP2001288076, 16 out. 2001.

TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T.; SAMMALKIVI, L.; IKÄHEIMO, I.; KOSKELA, M.; UHARI, M. Effect of xylitol on growth of *Streptococcus pneumoniae* in the presence of fructose and sorbitol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 166-169, 2001.

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

THE SANGER INSTITUTE. **Welcome Photo Library**. Disponível em < [www.sanger.ac.uk/Info/ Press/2004/040624.shtml](http://www.sanger.ac.uk/Info/Press/2004/040624.shtml) > . Acesso em: 05 out. 2005.

TIPLER, P. A. **Física**. Eletricidade, Magnetismo, Ótica. (Trad.: Horácio Macedo e Ronaldo de Biasi). 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, v. 2, 2000.

TRANSCRIPT of the discussion following the lectures of the Symposium on Atopic Dermatitis and *Staphylococcus aureus*. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 7, p. 38-42, 1996.

THREE B CO LTDA. Yoshinari Atsushiro. **Hypotensive agent containing pentitol or hexitol as active ingredient**. JP, JP20055306778, 11 abril 2005.

TISCHLER, A.S.; POWERS, J. F.; DOWNING, J. C.; RISEBERG, J. C.; SHAHSAVARI, M.; ZIAR, J.; McCLAIN, R.M. Vitamin D₃, lactose and xylitol stimulate chromaffin cell proliferation in rat adrenal medulla. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 140, p. 115-123, 1996.

TRAHAN, L.; BOUGEAU, G.; BRETON, R. Emergence of multiple xylitol-resistant (fructose PTS⁻) mutants from human isolates of Mutans streptococci during growth on dietary sugars in the presence of xylitol. **Journal of Dental Research**, v. 75, n. 11, p. 1892-1900, 1996.

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

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

UKKONEN, P.; VARIS, K.; JERNFORS, M.; HERVA, E.; JOKINEN, J.; RUOKOKOSKI, E.; ZOPF, D.; KILPI, T. Treatment of acute otitis media with an antiadhesive oligosaccharide: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 356, p. 1398-1402, 2000.

UMMC – University of Maryland Medical Center. **Dermatitis**. Disponível em < http://www.umm.edu/imagepages/atopic_dermatitis_overview_19323.htm >. Acesso em: 05 out. 2005.

USP- The United States Pharmacopoeia. USP XXI, 16th edition, 1985.

VERNACCHIO, L.; VEZINA, R. M.; MITCHELL, A. A. Tolerability of oral solution in young children: implications for otitis media prophylaxis. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 71, p. 89-94, 2007.

VOIROL, F. Xylitol becomes part of many foods. **Food Engineering International**, v. 2, n. 6, p. 40-41, 1977.

WANG, Y. M.; van EYS, J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. **Annual Review of Nutrition**, v. 1, p. 435-475, 1981.

WARREN, G. **National Renewable Energy Laboratory**: Handful of bagasse. Disponível em < http://www.nrel.gov/data/pix/searchpix.cgi?display_type=verbose&max_display=1&skip_hf=1&query=%5E03712 >. Acesso em: 06 fev. 2007.

WATANABE, S.; NARISAWA, Y.; ARASE, S.; OKAMATSU, H.; IKENAGA, T.; TAJIRI, Y.; KUMEMURA, M. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 3, p. 587-591, 2003.

WEISS, E. I.; KOZLOVSKY, A.; STEINBERG, D.; LEV-DOR, R.; GREENSTEIN, N.; FELDMAN, M.; SHARON, N.; OFEK, I. A high molecular mass cranberry constituent reduces mutans streptococci level in saliva and inhibits invitro adhesion to hydroxyapatite. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, p. 89-92, 2004.

WEN, Z.T.; BROWNGARDT, C.; BURNE, R.A. Characterization of two operons that encode components of fructose-specific enzyme II of the sugar: phosphotransferase system of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p. 337-342, 2001.

WELSH, M. J.; ZABNER, J. University of Iowa Research Foundation. **Use of xylitol to reduce ionic strength and activate endogenous antimicrobials for prevention and treatment of infections**. US 6.716.819 B2, 06 abr. 2004.

WHO/ FAO. Summary of toxicological data of certain food additives, Twenty- first Report of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives. **WHO Technical Report Series**, Geneva, n. 617, p. 124-147, 1977.

WIESE, S.; ASKANAZI, J.; MANNER, T.; KATZ, D. P.; BUTTRICK, P. Effect of substrate manipulation on reducing ischemia/ reperfusion injury in isolated perfused rat hearts. **Clinical Nutrition**, v. 14, p- 123-128, 1995.

WILLIAMS, J. V.; VOWELS, B.; HONIG, P.; LEYDEN, J. J. Antimicrobial Wound Management in the Emergency Department: An Education Supplement. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 1, p. 207-211, 1999.

WILSON, L. A. Bacterial conjunctivitis. In: DUANE, T. D.; JAEGER, E. A. **Clinical Ophthalmology**. Hagerstown, MD: Harper and Row, v. 4, 1980. p. 15-16.

WRIGHT, P. F. Xylitol sugar and acute otitis media. **Pediatrics**, v. 102, p. 971-972, 1998.

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

YOU XIN. YOU XIN. **Food capable of improving liver function**. CN, CN1228305, 15 set. 1999.

YOUNGMAN, L. A. Z. Ocular methicillin- resistant staphylococcus aureus infections: management difficulties and implications. **Clinical Eye and Vision Care**, v. 7, p. 219- 224, 1995.

ZABNER, J.; SEILER, M. P.; LAUNSPACH, J. L.; KARP, P. H.; KEARNEY, W. R.; LOOK, D. C.; SMITH, J. J.; WELSH, M. J. 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**, v. 97, n. 21, p. 11614-11619, 2000.

ZOPF, D.; ROTH, S. Oligosaccharide anti-infective agents. **Lancet**, v. 347, p. 1071-1021, 1996.

APÊNDICE A – Fluxograma ilustrando as etapas do ensaio de avaliação da propriedade de anti-aderência bacteriana do xilitol

APÊNDICE B – Tabelas referentes aos resultados obtidos dos ensaios de toxicidade dérmica aguda com doses repetidas

Tabela 12 – Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação gel de carbopol com xilitol a 5,0 % (p/ p)

Eritemas e escaras	Leitura	Coelho número						Média
		1	2	3	7	8	9	
Pele íntegra teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	1	1	1	1	1	0	0,67
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	1	1	0	1	0	0	0,5
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	1	0	0	0	0,16
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	1	0	0	0	1	0,33
	Dia 10	0	0	1	0	0	0	0,16
Pele escarificada teste	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	1	1	1	1	1	1	1
	Dia 3	0	1	0	0	1	0	0,33
	Dia 4	1	1	0	1	0	1	0,67
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	1	0	0	0	0,16
	Dia 7	0	0	0	0	1	0	0,16
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	1	0	0	1	1	0,50
	Dia 10	0	0	0	0	1	0	0,16
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal A: 3,8								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de eritema e escaras

LESÃO

Valor

Sem eritema0

Eritema leve (apenas perceptível)1

Tabela 13 – Avaliação da formação de edemas da formulação gel de carbopol com xilitol a 5,0 % (p/ p)

Edemas	Leitura	Coelho número						Média
		1	2	3	7	8	9	
Pele íntegra teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	1	1	0	0	0	0	0,33
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	1	0	0	0	0	0,16
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0

Subtotal B: 0,49

Classificação do aspecto da pele segundo segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de edema

LESÃO	Valor
Sem edema	0
Edema leve (apenas perceptível).....	1

Tabela 14 – Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação gel de carbopol (controle)

Eritemas e escaras	Leitura	Coelho número						Média
		1	2	3	7	8	9	
Pele íntegra controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	1	1	1	1	1	1	1
	Dia 3	1	1	1	1	0	0	0,67
	Dia 4	1	1	0	1	0	1	0,67
	Dia 5	1	1	1	0	0	0	0,50
	Dia 6	0	1	0	1	1	0	0,50
	Dia 7	0	1	1	0	1	0	0,50
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	1	1	0	1	1	0,67
	Dia 10	0	0	1	0	1	0	0,33
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	1	1	1	1	1	0	0,83
	Dia 3	1	1	1	0	1	0	0,67
	Dia 4	1	2	1	1	1	1	1,16
	Dia 5	1	1	0	0	0	0	0,33
	Dia 6	1	1	0	0	1	0	0,50
	Dia 7	0	1	1	0	1	0	0,50
	Dia 8	0	0	1	1	0	0	0,33
	Dia 9	0	1	1	0	1	1	0,67
	Dia 10	0	0	1	0	1	0	0,33
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal A: 10,16								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de eritema e escaras

LESÃO	Valor
Sem eritema	0
Eritema leve (apenas perceptível)	1
Eritema bem definido	2

Tabela 15 – Avaliação da formação de edemas da formulação gel de carbopol (controle)

Edemas	Leitura	Coelho número						Média
		1	2	3	7	8	9	
Pele íntegra controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	1	1	0	1	0	0	0,50
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	1	0	0	0	0	0,16
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal B: 0,66								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de edema

LESÃO

Valor

Sem edema0

Edema leve (apenas perceptível).....1

Tabela 16 – Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação gel de carbopol com xilitol a 10% (p/ p)

Eritemas e escaras	Leitura	Coelho número						Média
		4	5	6	10	11	12	
Pele íntegra teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	2	2	1	0	2	0	1,16
	Dia 3	1	0	1	0	1	0	0,50
	Dia 4	1	1	1	0	1	1	0,67
	Dia 5	0	1	0	0	1	0	0,33
	Dia 6	0	1	0	0	1	0	0,33
	Dia 7	0	1	1	1	1	0	0,67
	Dia 8	0	1	0	0	1	1	0,50
	Dia 9	0	1	0	0	1	0	0,33
	Dia 10	0	0	1	0	0	0	0,16
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	1	2	1	1	2	0	1,16
	Dia 3	1	0	1	1	1	1	0,83
	Dia 4	1	1	1	1	1	1	1
	Dia 5	0	0	1	0	0	0	0,16
	Dia 6	0	1	0	0	1	0	0,33
	Dia 7	0	1	0	1	1	0	0,50
	Dia 8	0	1	0	0	0	1	0,33
	Dia 9	0	1	0	0	1	0	0,33
	Dia 10	0	0	1	0	0	0	0,16
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal A: 9,45								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de eritema e escaras

LESÃO

Valor

Sem eritema0

Eritema leve (apenas perceptível)1

Eritema bem definido2

Tabela 17 – Avaliação da formação de edemas da formulação gel de carbopol com xilitol a 10% (p/ p)

Edemas	Leitura	Coelho número						Média
		4	5	6	10	11	12	
Pele íntegra teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	1	0	0,16
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	1	0	0	0	0	0,16
	Dia 3	0	0	0	0	1	0	0,16
	Dia 4	0	0	1	0	0	0	0,16
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal B: 0,64								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de edema

LESÃO

Valor

Sem edema0

Edema leve (apenas perceptível).....1

Tabela 18 – Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação gel de carbopol (controle)

Eritemas e escaras	Leitura	Coelho número						Média
		4	5	6	10	11	12	
Pele íntegra controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	1	2	0	1	2	0	1
	Dia 3	0	0	1	1	1	1	0,67
	Dia 4	1	1	1	1	1	1	1
	Dia 5	0	0	1	1	0	1	0,50
	Dia 6	0	1	1	1	1	1	0,83
	Dia 7	0	1	1	1	1	1	0,83
	Dia 8	0	1	0	0	1	1	0,50
	Dia 9	0	1	0	0	1	0	0,33
	Dia 10	0	0	1	0	0	0	0,16
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	1	2	0	1	2	0	1
	Dia 3	1	0	0	1	1	1	0,67
	Dia 4	1	1	1	1	1	1	1
	Dia 5	0	1	1	1	1	1	0,83
	Dia 6	0	1	1	1	1	1	0,83
	Dia 7	0	1	1	1	1	1	0,83
	Dia 8	0	1	0	0	1	1	0,50
	Dia 9	0	1	0	0	1	0	0,33
	Dia 10	0	0	1	0	0	0	0,16
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal A: 10,97								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de eritema e escaras

LESÃO

Valor

Sem eritema0

Eritema leve (apenas perceptível)1

Eritema bem definido2

Tabela 19 – Avaliação da formação de edemas da formulação gel de carbopol (controle)

Edemas	Leitura	Coelho número						Média
		4	5	6	10	11	12	
Pele íntegra controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	1	0	0,16
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal B: 0,16								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de edema

LESÃO

Valor

Sem edema0

Edema leve (apenas perceptível).....1

Tabela 20 – Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação creme lanette com xilitol a 5 % (p/ p)

Eritemas e escaras	Leitura	Coelho número						Média
		1	2	3	7	8	9	
Pele íntegra teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	1	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	1	0,17
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal A: 0,17								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de eritema e escaras

LESÃO

Valor

Sem eritema0

Eritema leve (apenas perceptível)1

Tabela 21 – Avaliação da formação de edemas da formulação creme lanette com xilitol a 5% (p/ p)

Edemas	Leitura	Coelho número						Média
		1	2	3	7	8	9	
Pele íntegra teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal B: 0								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de edema

LESÃO

Sem edema0

Valor

Tabela 22 – Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação creme lanette (controle)

Eritemas e escaras	Leitura	Coelho número						Média
		1	2	3	7	8	9	
Pele íntegra controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	1	0	0	0,17
	Dia 3	0	0	0	1	0	0	0,17
	Dia 4	0	0	0	1	0	0	0,17
	Dia 5	0	0	0	1	0	0	0,17
	Dia 6	0	0	0	1	0	0	0,17
	Dia 7	0	0	0	1	0	0	0,17
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal A: 1,02								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de eritema e escaras

LESÃO

Valor

Sem eritema0

Eritema leve (apenas perceptível)1

Tabela 23 – Avaliação da formação de edemas da formulação creme lanette (controle)

Edemas	Leitura	Coelho número						Média
		1	2	3	7	8	9	
Pele íntegra controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	1	0	0	0,16
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal B:0,16								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de edema

LESÃO	Valor
Sem edema	0
Edema leve (apenas perceptível).....	1

Tabela 24 – Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação creme lanette com xilitol a 10% (p/ p)

Eritemas e escaras	Leitura	Coelho número						Média
		4	5	6	10	11	12	
Pele íntegra teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal A: 0								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de eritema e escaras

LESÃO

Valor

Sem eritema0

Tabela 25 – Avaliação da formação de edemas da formulação creme lanette com xilitol a 10% (p/ p)

Edemas	Leitura	Coelho número						Média
		4	5	6	10	11	12	
Pele íntegra teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada teste	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
							Subtotal B: 0	

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de edema

LESÃO

Sem edema0

Valor

Tabela 26 – Avaliação da formação de eritemas e escaras da formulação creme lanette (controle)

Eritemas e escaras	Leitura	Coelho número						Média
		4	5	6	10	11	12	
Pele íntegra controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	1	0	0	0	0	0,17
	Dia 3	0	0	0	1	0	0	0,17
	Dia 4	1	0	0	0	0	0	0,17
	Dia 5	1	0	0	0	0	0	0,17
	Dia 6	1	0	0	0	0	0	0,17
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	1	1	1	0	0	0,50
	Dia 4	0	0	1	1	0	0	0,34
	Dia 5	1	0	0	1	0	0	0,34
	Dia 6	0	0	0	1	0	0	0,34
	Dia 7	0	0	0	1	0	1	0,34
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal A: 2,71								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de eritema e escaras

LESÃO

Valor

Sem eritema0

Eritema leve (apenas perceptível)1

Tabela 27 – Avaliação da formação de edemas da formulação gel de carbopol (controle)

Edemas	Leitura	Coelho número						Média
		4	5	6	10	11	12	
Pele íntegra controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Pele escarificada controle	Dia 1	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 3	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 4	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 5	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 6	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 7	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 8	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 9	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 10	0	0	0	0	0	0	0
	Dia 11	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal B: 0								

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959) (teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de edema

LESÃO

Sem eritema Valor

0

APÊNDICE C – Tabelas referentes aos resultados obtidos dos ensaios de fototoxicidade

Tabela 28 – Avaliação da formação de eritemas, escaras e edemas das formulações xilitol em gel, 8 – MOP em gel e a da base

Substância	Irradiação	Identificação do animal	Irradiação	1 h		24 h		48 h		72 h		96 h	
				Eritemas escaras	Edemas	Eritemas escaras	Edemas	Eritemas escaras	Edemas	Eritemas escaras	Edemas	Eritemas escaras	Edemas
Xilitol 10 % em gel	UVA	1	+	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0
			-	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		2	+	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
			-	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		3	+	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
			-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	+	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
			-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		5 C-	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		6 C-	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8- metoxi psoraleno em gel (2 mg/ g)		1	+	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
			-	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
		2	+	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
			-	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
		3	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	+	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
			-	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		5 C-	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		6 C-	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959)

Formação de eritema e escaras/ edemas

LESÃO

Valor

Sem eritema/ Sem edema 0

Eritema/ Edema leve (apenas perceptível) 1

Tabela 29 – Avaliação da formação de eritemas, escaras e edemas das formulações xilitol em creme, 8 – MOP em creme e a da base

Substância	Irradiação	Identificação do animal	Irradiação	1 h		24 h		48 h		72 h		96 h	
				Eritemas e escaras	Edemas	Eritemas e escaras	Edemas	Eritemas e escaras	Edemas	Eritemas e escaras	Edemas	Eritemas e escaras	Edemas
Xilitol 10 % em creme	UVA	7	+	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
			-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		8	+	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
			-	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		9	+	0	1	1	1	1	2	1	1	1	0
			-	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		10	+	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
			-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8- metoxi psoraleno em creme (2 mg/ g)		7	+	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
			-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		8	+	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
			-	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		9	+	0	2	1	1	1	1	1	1	1	0
			-	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		10	+	1	2	1	0	1	0	1	0	1	0
			-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11C-			+	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
			-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959)

Formação de eritema e escaras/ edemas

LESÃO

Valor

Sem eritema/ Sem edema 0

Eritema/ Edema leve (apenas perceptível) 1

Eritema/ Edema bem definido 2

ANEXO A – Classificação do aspecto da pele segundo descrito por Draize (1959)
(teste de toxicidade dérmica com doses repetidas)

Formação de eritema e escaras

LESÃO	Valor
Sem eritema	0
Eritema leve (apenas perceptível).....	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a grave.....	3
Eritema grave	4

Formação de edema

LESÃO	Valor
Sem edema	0
Edema leve (apenas perceptível).....	1
Edema bem definido (bordas menores que 1 mm)	2
Edema moderado a grave (bordas de 1 mm).....	3
Edema grave	4

O subtotal A é obtido somando os termos X (a média) referentes a todos os dados da tabela. Este valor depois será somado com o subtotal B.

Obtém-se o subtotal B somando os termos X (a média) referentes a todos os dados da tabela. A seguir tal valor é adicionado ao subtotal A, o resultado é dividido por cinco (o número de aplicações) e por quatro (eritema e edema em pele íntegra e escarificada). De acordo com o valor obtido a preparação farmacêutica contendo xilitol será classificado em categorias conforme pode ser conferido abaixo.

Faixa do valor encontrado e interpretação dos resultados:

0,0 – 1,0 = Não irritante

1,1 – 2,0 = Irritante moderado

2,1 – 3,0 = Irritante grave

3,1 – 4,0 = Corrosivo

ANEXO B – Classificação das lesões segundo descrito por Draize (1959) (teste de fototoxicidade)

Formação de eritema e escaras

LESÃO	Valor
Sem eritema	0
Eritema leve (apenas perceptível).....	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (vermelho violeta).....	4

Formação de edema

LESÃO	Valor
Sem edema	0
Edema leve (apenas perceptível).....	1
Edema bem definido (bordas menores que 1 mm)	2
Edema grave (bordas com mais de 1 mm).....	3

O poder de sensibilização relativo a eritemas e escaras é somado ao relativo a edemas, e a formulação teste é assim avaliada quanto à sua característica fotossensibilizante.

De acordo com o número de animais que apresentaram reações fototóxicas, a formulação-teste é assim classificada:

- 0-10 %: formulação-teste não fototóxica;
- 10-30 %: formulação-teste pouco fototóxica;
- 30-70 %: formulação-teste moderadamente fototóxica;
- 70-100 %: formulação-teste altamente fototóxica.

ANEXO C – Cópia dos Protocolos de Aprovação do Comitê de Ética referentes aos ensaios executados neste estudo utilizando animais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comitê de Ética na Experimentação Animal

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 016/2006-CEA sobre “AVALIAÇÃO DA FOTOSSENSIBILIDADE DO XILITOL SOB A FORMA FARMACÊUTICA DE CREME GEL A 5 E 10%” sob a responsabilidade de Dr. Nádia Rezende Barbosa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 04/04/2006.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 016/2006-CEA about “AVALIAÇÃO DA FOTOSSENSIBILIDADE DO XILITOL SOB A FORMA FARMACÊUTICA DE CREME GEL A 5 E 10%” sob a responsabilidade de Dr. Nádia Rezende Barbosa, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 04/04/2006.

Juiz de Fora, 04 de abril de 2006

Presidente/CEEA

Secretário/CEEA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comitê de Ética na Experimentação Animal

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 017/2006-CEA sobre "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA COM EFEITO LOCAL DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO XILITOL (CREME E GEL A 5 E 10%)" sob a responsabilidade de Dr. Nádia Rezende Barbosa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 04/04/2006.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 017/2006-CEA about "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA COM EFEITO LOCAL DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO XILITOL (CREME E GEL A 5 E 10%)." sob a responsabilidade de Dr. Nádia Rezende Barbosa, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEAA) in 04/04/2006.

Juiz de Fora, 04 de abril de 2006

Presidente/CEEAA

Secretário/CEEAA