

Efecto bacteriostático y/o bactericida del xilitol sobre cultivos de *Listeria monocytogenes*.

Morón de Salim Alba Rosa, Ramírez Mérida Luis Guillermo

Departamento de Bioquímica Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas-UC. Instituto de Investigaciones en Nutrición (INVESNUT). Universidad de Carabobo Sede Valencia

Unidad de Biotecnología Aplicada, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología (FACYT) Universidad de Carabobo Sede Valencia. Venezuela

RESUMEN. *Listeria monocytogenes* ha sido considerado como un patógeno emergente causante de enfermedades alimentarias. En la búsqueda de una vía alterna biocontroladora de su propagación, se propone al xilitol como posible agente bacteriostático y/o bactericida. El xilitol es un polirol derivado de la hidrogenación del monosacárido xilosa de relevancia en la industria farmacéutica por su efecto anticariogénico. Para comprobar el efecto del xilitol como posible agente bacteriostático y/o bactericida sobre *Listeria monocytogenes*, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), el tiempo mínimo de inhibición (TMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) de soluciones de xilitol en cultivos de *Listeria monocytogenes* ATCC 7635. Se aplicó el método de difusión en agar, utilizando soluciones de xilitol en concentraciones de 0 a 10%, respectivamente, para la CMI. El TMI se determinó por curvas de crecimiento en caldo Soya tripticasa con soluciones de 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10 y 20% de xilitol, respectivamente, con un inóculo inicial de 108 UFC de *Listeria monocytogenes* por mL en cada solución. Se observó que la CMI fue con la solución del 1% de xilitol; el TMI fue de 10 horas con las concentraciones de 1 a 10% y de 7 horas al aplicar 20% xilitol. Se comprobó que efectivamente el xilitol tiene poder bacteriostático sobre *Listeria monocytogenes* ($p < 0.001$), más sin embargo, no se obtuvo efecto bactericida en los ensayos realizados.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, xilitol, concentración mínima inhibitoria, tiempo mínimo inhibitorio

SUMMARY. **Bacteriostatic effect and/or xylitol bactericide of crops on *Listeria Monocytogenes*.** *Listeria monocytogenes* has been considered as an emerging pathogen causing foodborne illness. In the search for an alternate route biocontrol propagation, xylitol has been proposed as a possible bacteriostatic and / or bactericide. Xylitol is a polyol derived from the hydrogenation of xylose monosaccharide of importance in the pharmaceutical industry for its anti-cariogenic effect. To check the possible effect of xylitol as bacteriostatic and /or bactericidal against *Listeria monocytogenes*, it was determined the minimum inhibitory concentration (MIC), the time minimum inhibition (TMI) and minimum bactericidal concentration (MBC) of xylitol solutions on *Listeria monocytogenes* ATCC 7635. The agar diffusion method was applied, using xylitol solutions at concentrations of 0-10%, respectively, for the MIC. The TMI was determined by growth curves in trypticase soy broth with solutions 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10 and 20% of xylitol, respectively, with an initial inoculum of 108 CFU per ml of *Listeria monocytogenes* in each solution. MIC observed was the solution 1% of xylitol; the TMI was 10 hours to concentrations of 1 to 10% and 7 hours to apply 20% xylitol. It was found that xylitol has bacteriostatic power on *Listeria monocytogenes* ($p < 0.001$), but not bactericide effect.

Key word: Minimum inhibitory concentration, xylitol, *Listeria monocytogenes*

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), son consideradas una importante carga de enfermedad en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en países menos desarrollados, las ETA son la principal causa de enfermedad y muerte, asociadas a una carga socio-económica significativa. En los países desarrollados, las ETA son responsables de

los altos niveles de pérdida de productividad, costos asociados al uso de los servicios de salud y a la implementación y monitoreo de políticas de inocuidad de los alimentos (1).

Alrededor de 250 agentes causantes de ETA, han sido descritos, entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales (2). Los cambios en los hábitos alimentarios de la sociedad, así como el consumo de alimentos envasados,

comidas fuera del hogar, expendio de comidas preparadas y comidas rápidas, son factores que contribuyeron al incremento de las ETA (3).

Por otro lado, se ha estimado que un 30%, de la población en países industrializados se ha visto afectada por ETA, mientras que en los países en vías de desarrollo la incidencia pudiese ser mayor (1), siendo *Listeria monocytogenes*, una de las bacterias responsables; las enfermedades causadas son producidas por el consumo de alimentos contaminados con este microorganismo; afectando principalmente a mujeres embarazadas, a recién nacidos y hospederos inmunodeprimidos (4). Esta bacteria puede ser aislada del suelo, agua, vegetales y contenido fecal de una amplia gama de animales; es un contaminante común de alimentos frescos y procesados, de origen animal y vegetal (hortalizas), leche y lácteos no pasteurizados, carne de vaca, cerdo y aves, embutidos ahumados o fermentados y pescados ahumados. Es capaz de producir biofilm en alimentos, crece a temperaturas de refrigeración, resiste condiciones adversas de pH y altas concentraciones de NaCl. Dadas estas características y el hecho de ser ubicua, *L. monocytogenes* tiene muchas oportunidades de entrar a las líneas de producción de alimentos y colonizar—en 1 a 10% causar portación transitoria—o enfermar a quienes los ingieren. (4). El inóculo exacto y el periodo de incubación son desconocidos; se cree que se necesitan más de 103 microorganismos y entre 11 y 70 días para que se produzca la infección invasiva (5,6).

En Venezuela no se han confirmado casos de listeriosis, sin embargo, vale acotar que entre los datos disponibles de ETA en el país, se reportaron 37 brotes con 950 personas afectadas para el año 2003 (7).

Si bien es cierto que la incidencia anual de listeriosis puede parecer relativamente baja en comparación con otras ETAs, hay que considerar que esta patología se ha posicionado como una de las enfermedades transmitidas por alimentos más importantes, debido al aumento de la población susceptible, las implicaciones a nivel clínico y su alta tasa de letalidad, así como la ubicuidad del patógeno lo que hace que *Listeria monocytogenes*, emerja, hoy en día, como uno de los microorganismos de mayor riesgo para las poblaciones susceptibles y donde los alimentos que son su principal vehículo de diseminación, estén totalmente libres de este microorganismo, dado que los tratamientos utilizados en la industria alimenticia, para disminuir o

eliminar la carga bacteriana, no son del todo eficaces frente a *Listeria monocytogenes* (8-10).

En este sentido y con la intención de aportar medios sencillos y eficaces que permitan reducir al mínimo la cantidad de *Listeria monocytogenes* en los alimentos se propuso la utilización de soluciones de xilitol, sustancia no tóxica y con un potencial efecto bacteriostático y/o bactericida sobre *Listeria monocytogenes*.

El xilitol, poliol derivado de la hidrogenación del monosacárido xilosa; se presenta en pequeñas cantidades, en frutas y verduras y producido por ciertos hongos y levaduras. Es un intermediario del metabolismo de los carbohidratos en humanos; no altera los niveles de glucosa en sangre, por lo que ha sido el sustituto de la glucosa en pacientes diabéticos, lo que le ha dado al xilitol especial relevancia en la industria farmacéutica y alimenticia (11,12).

En un estudio realizado para comprobar la eficacia de la utilización de xilitol en la prevención de la caries dental en niños pequeños, los investigadores indicaron que no se observaron diferencias significativas en los niveles de estreptococos mutans y lactobacilos durante el tiempo de experimentación, pero si observaron que la aplicación diaria xilitol redujo significativamente la incidencia de caries en los niños en comparación con aquellos que no usaron xilitol, lo que sugiere que el uso de xilitol puede ser un complemento útil para el control de la caries en los niños (13).

Otros experimentos in vitro comprobaron que el xilitol inhibe el crecimiento de *Streptococcus pneumonia* y reduce la adhesión del *Haemophilus influenzae* en las células de la nasofaringe, de igual modo se ha demostrado que previene los casos de otitis media aguda en infantes (14,15).

Tomando en consideración el comprobado efecto biológico que el xilitol ha tenido sobre microorganismos, así como la capacidad de no alterar las propiedades organolépticas de los alimentos, se propuso evaluar el efecto bacteriostático y/o bactericida que pudiesen tener soluciones de xilitol frente a *Listeria monocytogenes*.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de Soluciones de Xilitol.

Se prepararon soluciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 20% de xilitol grado analítico (Sigma Chemical

Co.) y ajustada con solución Buffer fosfato pH 7,5

Preparación del Inóculo.

Se usó la técnica de Ramírez y col 2012 (16). Para ello se tomó una azada del cultivo de *Listeria monocytogenes* ATCC 7635 y se sembró en placas de agar nutritivo, incubándose a 35°C por un período de 4 a 6 horas, para lograr la fase logarítmica. Posteriormente, de este cultivo, se tomaron azadas de las colonias y se preparó una suspensión con agua estéril, ajustando la densidad de la suspensión del cultivo por comparación de su turbidez con el estándar de 0,5 de Mc Farland de BaSO₄, mediante este procedimiento se garantizó un inóculo inicial de 10⁸ UFC de *Listeria monocytogenes*/mL.

Método de difusión en Agar.

Se aplicó el método de Kirby Barner, empleado por Ramírez y col 2012 (16). Para esta prueba se prepararon placas de Petri con agar PALCAM con un grosor de 6 mm en cada placa. Una vez solidificado el agar, se impregnaron hisopos estériles con la solución de *Listeria monocytogenes* ATCC 7635 y se procedió a inocular cada una de las placas, cubriendo todo el espacio disponible, hasta obtener una distribución uniforme de las colonias. Por otro lado, discos de papel de filtro Watman N° 54, con diámetro de 6 mm, y estériles, fueron impregnados con las soluciones de concentraciones específicas de xilitol, previamente preparadas, y se colocaron en las placas inoculadas anteriormente; se colocaron cinco (5) discos de concentraciones diferentes de extracto de xilitol por placa inoculada. Las placas fueron incubadas a 37°C, se observaron a las 24 y 48 horas de incubación. Los halos de inhibición alrededor de los discos, fueron medidos con una regla milimetrada, los ensayos se llevaron a cabo por duplicado. Como patrón de referencia, de los antibiogramas, se utilizaron discos de Ampicilina y Gentamicina específicos para la inhibición de *Listeria* en concentraciones de 10 µg respectivamente.

Determinación del tiempo mínimo de inhibición (TMI).

Se siguió la metodología empleada por Ramírez y col [16]. El tiempo mínimo de inhibición se determinó midiendo el crecimiento bacteriano, en medios de cultivos de caldo nutritivo al cual se le añadieron soluciones de 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10 y 20% de xilitol,

respectivamente. Se tomaron nueve (9) frascos de Erlenmeyer de 50 mL y se dispensaron 10 mL de caldo nutritivo a cada uno, luego los frascos se autoclavarón a 121°C por 15 min. Una vez autoclavados, a cada uno de los frascos se les agregó 10 mL de solución de xilitol. En el número 1 se agregó solución al 1%, en el 2 al 2% y así sucesivamente. Seguidamente se tomó uno de los frascos y se colocaron 10 mL de agua estéril, reservándola como solución de 0% xilitol. El frasco restante sólo contenía caldo nutritivo, siendo utilizado como blanco. A cada uno de los frascos, a excepción del frasco con solución blanco, se agregó 0,1 mL de suspensión de *Listeria monocytogenes* 10⁸ UFC/mL

Inmediatamente después de inocular las soluciones con la suspensión bacteriana, se procedió a medir la absorbancia de cada una, utilizando un espectrofotómetro Thermo Spectronic Génesys UV, con una longitud de onda de 540 nm.

Todos los frascos con las soluciones fueron incubados a 37°C y a intervalos de una hora se le realizaron las mediciones de absorbancia de cada solución hasta una vez transcurridas 48 horas desde la primera medición. Con los datos obtenidos se graficaron las curvas de crecimiento respectivas.

Se comparó la curva resultante de cada concentración de la solución de xilitol con la curva de 0%, a fin de evidenciar diferencias significativas en el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por duplicado.

Concentración Bactericida Mínima.

La prueba para determinar la Concentración Bactericida Mínima se realizó sólo en aquellos caldos en los que no se obtuviera crecimiento bacteriano, es decir, absorbancia cero, en las mediciones para las curvas de crecimiento a las respectivas concentraciones de xilitol, en la prueba de Tiempo Mínimo de Inhibición. De cada uno de esos frascos de Erlenmeyer, se tomó una azada de ese caldo, y se sembró en una placa de Petri con agar Palcam, utilizando para ello una espátula de Drigalski. Este mismo procedimiento se realizó en los frascos contentivos de las soluciones de xilitol donde no se apreció crecimiento bacteriano alguno, o resultantes de 0% absorbancia. Cada una de las placas se incubó a 37°C durante 24h.

Luego de las 24h se observaron las placas y se seleccionaron aquellas en la que no hubo crecimiento

bacteriano y cuyo inóculo provino del frasco con menor dilución. La menor dilución en la que no se desarrollaron bacterias en la placa se tomó como la concentración bactericida mínima.

Análisis de los Datos.

Los datos relativos a la formación o no del halo de inhibición microbiológico, así como su grosor, se promediaron, se procesaron a través de un análisis descriptivo (media aritmética) y se construyeron diagramas de cajas y aristas (BOX & WHISKER PLOT) en relación a la media de los halos de inhibición obtenidos.

Para determinar cambios en la dinámica de crecimiento en *Listeria monocytogenes*, de acuerdo a las concentraciones de soluciones de xilitol usadas en el estudio, se promediaron y se graficaron las densidades ópticas obtenidas, a fin de presentar las respectivas curvas de crecimiento microbiano, comparando cada uno de los tratamientos mediante la aplicación de la prueba de correlación de Spearman (prueba no paramétrica que mide la diferencia entre una distribución observada y otra esperada). Los datos fueron procesados a través del programa estadístico STATISTIX 9.0.0.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los halos de inhibición logrados en los cultivos de *Listeria monocytogenes* al aplicar diferentes concentraciones de soluciones de xilitol por el método de difusión en agar. Se puede apreciar que todas las concentraciones de xilitol ejercieron cierto efecto bacteriostático o inhibidor sobre la bacteria *Listeria monocytogenes* al obtenerse halos de inhibición con cada una de las concentraciones.

En la Figura 1 se aprecia que los halos de inhibición se hacen más grandes a medida que aumenta la concentración de xi-

TABLA 1 Halos de inhibición obtenidos con diferentes concentraciones de xilitol en cultivos de *Listeria monocytogenes*.

Concentración (%)	A (diámetro en mm)	B (diámetro en mm)	Media
1	2	2	2
2	1	2	1,5
3	1	2	1,5
4	2	1	1,5
5	2	2	2
6	2	3	2,5
7	3	3	3
8	2	3	2,5
9	2	3	2,5
10	3	4	3,5

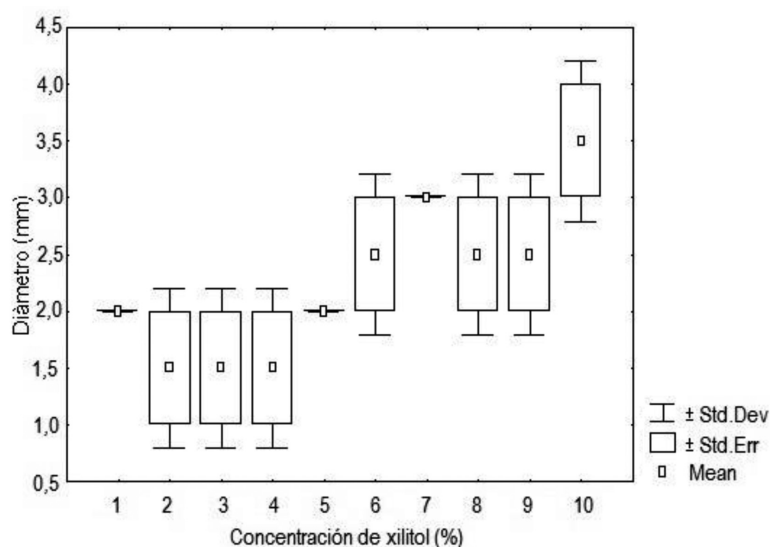


FIGURA 1 Diagrama de cajas y aristas (BOX & WHISKER PLOT) por grupo con relación al diámetro del halo de inhibición de los discos en el cultivo de *Listeria monocytogenes* en presencia de xilitol.

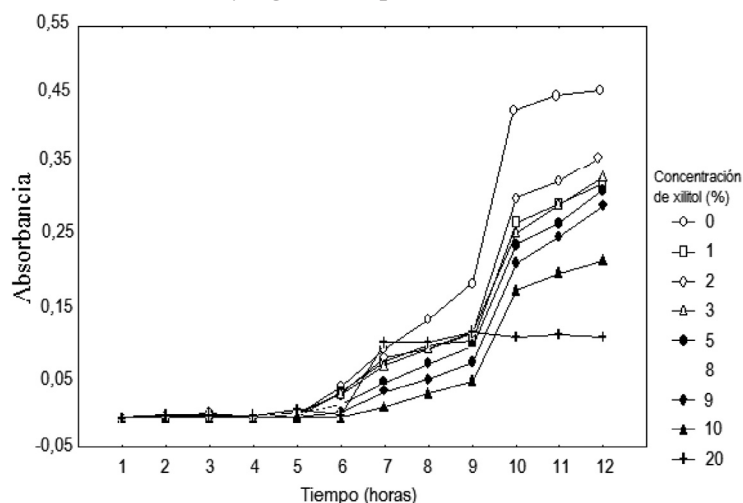


FIGURA 2 Curva de crecimiento bacteriano de *Listeria monocytogenes* a diferentes concentraciones de xilitol.

litol, lo que hace evidentemente que existe una correlación entre la concentración de xilitol y su efecto inhibitorio sobre *Listeria monocytogenes*.

Por otro lado las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* se muestran en la Figura 2, se observa la curva control en caldo nutritivo (0% xilitol), frente a las curvas de crecimiento del microorganismo en soluciones de xilitol a concentraciones de 1, 2, 3, 5, 8, 9 y 10 por ciento respectivamente. En la curva con 0% de xilitol o curva control, se aprecia que durante las 5 primeras horas no hubo crecimiento de la bacteria luego de realizado el inóculo, cumpliéndose la fase de latencia o adaptación, culminando esta fase a las 5 horas.

Posteriormente el microorganismo entra en la fase logarítmica o exponencial, que se representa por un pico máximo de absorbancia de 0,426 a las 10 horas de incubación para luego caer en fase estacionaria hasta el final de las mediciones. Durante las primeras 5 horas, posteriores al inóculo del microorganismo, las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* mantienen un patrón similar, por encontrarse en fase adaptativa; sin embargo, a partir de la hora 6 existe una clara diferencia entre la curva control y las curvas resultantes de la aplicación de xilitol a sus diferentes concentraciones (1-10%), ya que las absorbancias son menores, indicando que existe un menor crecimiento de la bacteria en presencia de xilitol. Sin embargo, el inicio de la fase exponencial ocurre a las 6 horas post inóculo y la misma culmina a las 10 horas, tal como sucede en la curva control.

La curva de 20% xilitol muestra un periodo de adaptación más prolongado, ya que este se extiende durante las primeras 6 horas post inóculo. Pasada esta hora la curva entra en fase exponencial logrando un pico de absorbancia de 0,101 a la hora 7, donde luego entra en fase estacionaria hasta el final de las mediciones. Con ello se evidencia que la fase logarítmica de la curva sólo tuvo una hora de duración, acortándose sustancialmente en relación a las curvas observadas en las demás concentraciones de xilitol. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) al relacionar la curva de crecimiento normal con respecto a las distintas soluciones de concentraciones variables de xilitol.

Los resultados mostrados indican que el xilitol efectivamente reduce el crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante la fase exponencial, manteniéndose luego por debajo de los valores registrados en la

curva control. Tal efecto del tipo bacteriostático se incrementa a medida que aumenta la concentración de xilitol y es posible observarlo en cada una de las soluciones aplicadas.

Mención aparte merece el comportamiento observado en la curva con 20% de xilitol, ya que se pudo lograr una sustancial inhibición en el desarrollo de la bacteria, si se compara con el resto de las curvas.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se relacionan con los logrados por Kurola y col. (17), quienes señalaron que el xilitol inhibe el crecimiento de bacterias como *Streptococcus pneumoniae*. En los ensayos clínicos, el xilitol reduce la incidencia de otitis media aguda en niños, pero no disminuye el portador nasofaríngeo de neumococos. La exposición al xilitol en soluciones de 0,5% redujo los valores de densidad óptica, que fueron utilizados como una indicación de la biopelícula que puede explicar en parte la eficacia de xilitol para prevenir la otitis media aguda en los ensayos clínicos; efecto que de igual manera se incrementa con el aumento de la concentración de xilitol, en el presente trabajo, ya que con 1% de xilitol el porcentaje de inhibición logrado fue aproximadamente 35% y de 72% de inhibición al aplicar 5% de xilitol. De esta manera se confirma la relación existente entre la concentración de xilitol y su efecto inhibitorio frente a ciertas bacterias, tal como es el caso también de *Listeria monocytogenes*.

Esta consecuencia podría explicarse por el hecho de que *Listeria monocytogenes* cuenta con un sistema llamado fructosa fosfotransferasa identificado por Mitchell y col. (18) y Tapiainen y col. (19), quienes explican el efecto negativo sobre *S. pneumoniae*; los investigadores presumen que el sistema fructosa fosfotransferasa permite el ingreso del xilitol al citoplasma del microorganismo y que por ausencia de las enzimas necesarias para su metabolismo, éste se acumula hasta alcanzar niveles tóxicos.

Por otro lado Tapiainen (20), propone una segunda hipótesis de cómo el xilitol puede ocasionar daño en la pared celular de *S. pneumoniae*, volviéndola irregular y desapareciendo su estructura trilaminar, por cuanto mediante este sistema se ingresa xilitol al citoplasma y se envía constantemente al exterior, ocasionando con ello un gasto innecesario de energía

produciendo mediante este mecanismo un daño irreparable en la bacteria. Es por esta razón que se cree que el efecto inhibitorio producido por el xilitol sobre *Listeria monocytogenes* pudo haberse proporcionado por esta vía.

Un estudio precedente relacionó el efecto del xilitol en el crecimiento de *S. pneumoniae* en presencia de fructosa y sorbitol, en el cual la adición de 5% de xilitol a los medios de cultivos en estudio, resultó en una marcada inhibición del neumococo, efecto que fue totalmente eliminado en presencia de fructosa, pero permaneció en los casos en que se agregó xilitol más sorbitol y glucosa, demostrando de esta manera que la inhibición de *S. pneumoniae* está mediada por el sistema fructosa fosfotransferasa (21).

En la presente investigación se puede concluir, que se evidenció que la solución de 1% de xilitol logra una acción bacteriostática sobre *Listeria monocytogenes*, incrementándose el efecto conforme se aumenta la concentración de xilitol. No se observó secuela bactericida alguna con las concentraciones de xilitol empleadas. Por otro lado, al utilizar soluciones del 1% al 10% de xilitol, el tiempo mínimo de inhibición fue de 10 horas, mientras que con la solución de 20% el tiempo mínimo de inhibición fue de 7 horas. Se observó que el xilitol, tuvo un efecto bacteriostático estadísticamente significativo ($p < 0,01$). Se concluye que el xilitol tiene potencial para ser usado, en la industria alimenticia, como agente preservante de ciertos alimentos, dado que tiene la ventaja de no generar cambios sustanciales en las propiedades organolépticas de los alimentos, de esta forma su uso en el campo alimenticio podría ser prometedor.

REFERENCIAS

- Organización Mundial de la Salud WHO. 2007. Consultation to develop a strategy to estimate the global burden of foodborne diseases. World Health Organization, Geneva Switzerland. Available at: http://www.who.int/foodsafety/publications/food_bornedisease/burdensept06/en/index.html.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman J L, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451(7181): 990-3.
- Olea A, Díaz J, Fuentes R, Vaquero A, García M. Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile *Rev Chilena Infectol* 2012; 29 (5): 504-510
- Benadof D. Microbiological portrait: *Listeria monocytogenes* *Rev Chilena Infectol* 2008; 25(6):486
- Salas, J. Listeriosis, una infección poco frecuente 2002. Disponible en: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2002/01/15/629.php>
- Rossi M, Paiva A, Tornese M, Chianelli S, Troncoso A. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. *Rev Chilena Infectol* 2008; 25 (5): 328-325.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO]/ Organización Mundial para la Salud [OMS]. Situación actual del control de la inocuidad de alimentos en Venezuela: análisis de la situación 2005. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/010/af112s.pdf>.
- Olivares R. *Listeria monocytogenes*: an old bacteria, an ongoing challenge. *Medwave* 2009 Jun; 9(6):e3994 doi: 10.5867/medwave.2009.06.3994
- Larraín de la CD, Abarzúa CF, Jourdan HF, Merino OP, Belmar JC, García CP. Infecciones por *Listeria monocytogenes* en mujeres embarazadas: experiencia del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile. *Rev Chilena Infectol* 2008; 25(5):336-41.
- Jackson KA, Iwamoto M, Swerdlow D. Pregnancy-associated listeriosis *Epidemiol and Infect* 2010; 138(10):1503-9.
- Makinen KK. The Rocky Road of Xylitol to its Clinical Application *J Dental Res* 2000; 79 (6):1352-1355.
- Nápoles A, Diazz M, Acosta E, González M, Manganelly E. Tecnología del Proceso de Obtención de Licores de Xilosa a partir de Bagazo de Caña, para la Producción Biotecnológica de Xilitol. *Brazilian J Food Technol* 2005; 57-64.
- Zhan L, Cheng J, Chang P, Ngo M, Denbesten PK, Hoover CI, Featherstone JD. Effects of xylitol wipes on cariogenic bacteria and caries in young children. *J. Dent. Res.* 2012; 91(7 Suppl):85S-90S.
- Hayes C. The Effect of Non-Cariogenic Sweeteners on the Prevention of Dental Caries: A Review of the Evidence. *J Dent. Educ.* 2001; 65(10):1106-1109.
- Kontiokari, T, Uhari M, Koskela M. Antiadhesive effects of xylitol on otopathogenic bacteria. *J. Antimicrob. Chemother* 1998; 41 (5): 563-565
- Ramírez-Mérida LG, Morón de Salim A, Catinella R, Castillo L. Efecto bacteriostático y/o bactericida del extracto de gel de Aloe vera sobre cultivos de *Listeria monocytogenes*. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 2012; 62(1): 73-78
- Kurola P, Tapiainen T, Sevander J, Kaijalainen T, Leinonen M, Uhari M, Saukkoriipi A. Effect of xylitol and other carbon sources on *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and gene expression in vitro

- APMIS. 2011; 119(2):135-42.
18. Mitchell W, Reizer J, Herring C, Hoischen C, Saier M. Identification of a Phosphoenolpyruvate: Fructose Phosphotransferase System (Fructose-i-Phosphate Forming) in *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 1993; 175 (9): 2758-2761
19. Tapiainen T, Sormunen R, Kaijalainen T, Kontiokari T, Ikaheimo I, Uhari M. Ultrastructure of *Streptococcus pneumoniae* after exposure to xylitol. J. Antimicrob. Chemother 2004; 54 (1):225-228
20. Tapiainen T. Microbiological effects and clinical use of xylitol in preventing acute otitis media, 2002 Tesis Doctoral Disponible en: <http://herkules oulu.fi/issn03553221/>
21. Tapiainen T, Kontiokari T, Sammalkivi L, Ikaheimo I, Koskela M, UHARI M. Effect of Xylitol on Growth of *Streptococcus pneumoniae* in the Presence of Fructose and Sorbitol. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45 (1): 166–169.

Recibido: 06-06-2013

Aceptado: 09-08-2013