ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA BIOTINA

IZADORA FERNANDA DOS SANTOS; JULIANA MARIA FAZENDA; LUCAS DE PAULA RAMOS

RESUMO

Segundo a lista de patógenos fúngicos prioritários da OMS (Organização Mundial da Saúde) para orientar pesquisa, desenvolvimento e ação de saúde pública publicada em 2022, a espécie *albicans* é categorizada como grupo de prioridade crítica, já que o gênero *Candida albicans* é rotulado como patógeno oportunista responsável por milhares de mortes decorrentes de infecções hospitalares, além de ser causador de septicemias e candidemias ao redor do mundo. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar através de testes *in vitro* a existência ou não de ação antifúngica da biotina sobre culturas planctônicas e biofilmes de *C.albicans* pelo método CIM e CMM. Para a realização dessa pesquisa foram utilizadas cápsulas de biotina pura manipulada de 1 grama, diluída em caldo próprio, e aplicada em cepa do fungo, onde o meio de cultura utilizado para a semeadura foi o ágar BHI em placa de 96 poços. Esperava-se com esses testes que a biotina manipulada apresentasse ação antifúngica em colônia de *Candida albicans* a fim de buscar métodos alternativos de tratamento de candidoses e consequente diminuição da taxa de mortalidade especialmente em casos de candidíases invasivas através da administração de biotina. No experimento realizado não houve taxa de resposta inibitória positiva entre as cepas de referência de *C. Albicans* (ATCC 18804) testadas, o que demonstra o quão importante é a introdução de novos produtos de amplo espectro antifúngico no mercado farmacêutico para tratamento de infecções provocadas por patógenos oportunistas como os testados.

Palavras-chave: Biotina; Antifúngico; *Candida albicans.*

1 INTRODUÇÃO

No atual cenário mundial o gênero *Candida* pode ser categorizado como terceira maior causa de septicemia, e em nível Brasil sétima maior causa de infecções sanguíneas causadas por microorganismos. Dessa maneira, os quadros de candidoses são causa de potencial morbidade e mortalidade, principalmente em pacientes imunosuprimidos e hospitalizados, o que acarreta em altos custos com internações, tanto em âmbito de rede pública de atendimento quanto em rede privada em todo mundo. (ROCHA et al., 2021, YANAMOTO et al., 2012)

Como forma terapêutica a indústria farmacêutica atual exibe uma grande variedade de antifúngicos para tratamento de candidoses. Não obstante, o uso errôneo desses fármacos, geralmente sem prescrição médica, torna susceptível que esses indivíduos que se automedicam desenvolvam o que segundo Vieira e Santos (2017), denonimam resistência fúngica, ou seja, pouca ou nenhuma efetividade terapêutica.

Os relatos de resistência fúngica em Candida albicans, uma vez escassos, atualmente proliferam devido ao uso prolongado de antifúngicos decorrente de infecções recorrentes e à complexidade diagnóstica dos pacientes. A administração tardia e o recurso a classes adicionais de agentes antifúngicos, como azólicos, poliênicos e imidazólicos (e.g., fluconazol, Anfotericina B, cetoconazol), exacerbam as condições clínicas. O aumento incidencial de

DOI: 10.51161/conamic2024/30334

hepatoxicidade e alterações nas enzimas hepáticas, notadamente elevações de transaminases e bilirrubina, associado à terapia oral com antifúngicos, pode precipitar quadros de hepatite medicamentosa. (ARENDRUP; PATTERSON, 2017; HASHMI; HERRICK 2003 e MOREIRA 2010)

Segundo Rivero, 2017; Silva et al.,2021, os microorganismo da espécie *albicans* se caracterizam como células simples, mas dimórficas, com parede celular alongada. O fungo *Candida albicans* se reproduz por brotamento, formando blastoconídeos quando em estado saprofítico. A capacidade de aderência e formação de biofilme é um mecanismo de resistência do gênero *Candida*, semelhante ao processo realizado pelas bactérias. O microorganismo recruta células para colonizar superfícies, iniciando a proliferação celular e formando pseudohifas e hifas após 20-24 horas. Esse processo busca colonizar novas superfícies e/ou tecidos. O gênero *Candida* possui ainda recursos enzimáticos e estruturais que facilitam sua invasão e proliferação, escapando das defesas imunológicas do hospedeito.

Sabe-se que para o correto funcionamento das funções vitais dos seres vivos nutrientes essenciais, ou seja, aqueles que não são sintetizadas de maneira espontânea nas rotas metabólicas, sejam introduzidas no nosso organismo, seja através de alimentação ou suplementação por fármacos. Os nutrientes essenciais podem ser classificados em 6 grupos, como exemplo carboidratos, proteínas, lipídios, minerais, e ainda as vitaminas, que podem ser encontradas popularmente em farmácias como suplemento vitamínico. (KESARI; NOEL, 2022)

É sabido que vitaminas e poli vitamínicos são amplamente consumidos sem prescrição médica, pois são considerados fármacos promotores da saúde, ou seja, benéficos para todas as faixas etárias. No entanto esses suplementos frequentemente contém uma variedade de excipientes, como é o caso da biotina utilizada no presente estudo. Essa vitamina é comercializada para tratamento de alopecia, queda de cabelo, fortalecimento de unhas e estudo recentes ainda implementaram sua utilização para tratar sequelas pós-COVID. Diante da presença desses excipientes, o atual experimento utilizou de formulação manipulada da biotina, buscando uma compreensão mais específica e controlada de seus efeitos. (GEWEHR et al., SILVA et al.,2017)

A biotina, também conhecida como vitamina H ou B7, utilizada como fármaco nos testes experimentais é considerada solúvel tanto em água, como em álcool/etanol. Esse fármaco atua como enzima essencial no metabolismo de gorduras, carboidratos e aminoácidos. Sua absorção intestinal é mediada pelo transportador multivitamínico dependente de sódio (SMVT). A biotina, devido à sua solubilidade em água, acaba não sendo armazenada pelo organismo, sendo o excesso excretado 60% pela urina, enquanto a excreção biliar é limitada. O SMVT desempenha um papel crucial na absorção hepática, reabsorção renal e nos tecidos periféricos da biotina. (LYKSTAD; SHARMA,2023; ZEMPLENI et al.,2009)

Conforme exposto anteriormente, atualmente ainda não existem trabalhos publicados que demonstrem a ação antifúngica da biotina, diante disso, o presente trabalho tem por objetivo averiguar a precisão do inócuo durante a montagem dos testes de susceptibilidade por micro diluição, bem como mensurar o perfil de sensibilidade de *Candida albicans* à Biotina em sua fórmula manipulada pelo método CIM (Concentração Inibitória Mínima) e também pelo método CMM (Concentração Microbicida Mínima) pela CLSI.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo caracteriza-se por uma pesquisa de caráter experimental com abordagem quanti e qualitativa realizado no Instituto Taubaté de Ensino Superior através de formulação manipulada de biotina com composição de 1 grama em pó, sem excipientes, na farmácia Pharma Express Center, na cidade de Aparecida, São Paulo.

DOI: 10.51161/conamic2024/30334

2.1. Avaliação da atividade antimicrobiana da Biotina

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Taubaté de Ensino Superior. A avaliação da atividade antimicrobiana da biotina foi avaliada sobre cepas de referência (ATCC- American Type Culture Collection) de *Candida albicans* (ATCC 18804). As cepas foram provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências e Tecnologia (ICT/UNESP) de São José dos Campos.

2.1.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

Para a determinação do CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), normas M7-A7 e M27-A2. Os inóculos foram preparados a partir de cultura de 24 horas incubadas em Ágar Sabouraud em placa de Pétri e após em estufa bacteriológica (37ºC, com 5% de CO2 para *C. albicans*) e padronizada em espectrofotômetro, de acordo com as recomendações da NCCLS (2006), esta suspensão do inóculo foi ajustada na escala 0,5 de Mc Farland em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530nm. O teste foi realizado em microplacas, como demonstrado na Figura 1, ondem foram distribuídos 100 µL de meio de cultura em todos os poços (N= 8 por grupo), após isso 100 µL de biotina diluída em caldo BHI (200mg/ml) foram adicionados apenas no primeiro poço do grupo, de onde partiu uma série de 8 diluições seriadas em 8 linhas (A até H) em duplicata, ou seja, 2 colunas (1 a 2) para comprobatoriedade.

Após incubação de 24 horas, A CIM pôde ser determinada no último poço da microplaca de 96 poços que se não apresentasse turvação, indicaria que houve crescimento microbiano. Para determinar a CMM da biotina foi inoculado em ágar Brain Heart Infusion (BHI – Himédia) 10 µL da CIM, bem como 10 µL de uma concentração acima e de outra abaixo dela, após isso, a placa foi inclinada para que as gotas despejadas na placa escorressem e formassem um rastro. Após 48 horas de incubação, foi avaliado que as placas apresentaram crescimento de colônias, não sendo possível a determinação tanto da CIM, quanto da CMM de cada concentração de biotina utilizada no rastro no qual não houve o desenvolvimento de colônias.

A concentração inicial de biotina inicial testada de 200mg/ml e nas diluições 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 que apresentassem a CMM seriam testadas sobre biofilmes monotípicos *in vitro*, etapa que não foi realizada devido o resultado negativo da ação antimicrobiana da solução de biotina no primeiro teste realizado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após incubação de 24 horas, A CIM não pôde ser determinada no último poço da microplaca de 96 poços, pois a solução de biotina já exibe natural turbidez, dessa maneira a análise passou a ser inteiramente creditada a CMM.

Após o teste de Concentração Microbicida Mínima observou-se que a aplicação de biotina nas concentrações de 200mg/ml no teste de micro diluição em caldo BHI em colônia de *C. albicans* não resultou em efeito antimicrobiano. Portanto, não foram observados valores tanto de CIM quanto de CMM após cultivo em ágar Sabouraud e incubação em estufa microbiológica por um período de 48 horas conforme demonstrado na **Tabela 1**.

DOI: 10.51161/conamic2024/30334

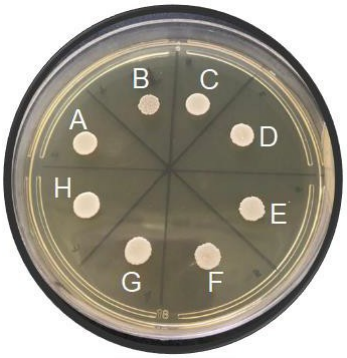
Tabela 1. Resultados obtidos através do teste CIM e CMM realizados no laboratório clínico do Instituto Taubaté de Ensino Superior no dia 27 de setembro de 2023.

POSIÇÃO DOS POÇOS	CONCENTRAÇÃO TESTADA (mg/mL)	DILUIÇÃO	RESULTADOS DOS TESTES DE CIM e CMM
A	200 mg/mL	1:1	Ausente
B	100 mg/mL	1:2	Ausente
C	50 mg/mL	1:4	Ausente
D	25 mg/mL	1:8	Ausente
E	12,5 mg/mL	1:16	Ausente
F	6,25 mg/mL	1:32	Ausente
G	3,125 mg/mL	1:64	Ausente
H	1,5625 mg/mL	1:128	Ausente

Fonte: própria

Figura 1. Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Leitura da microdiluição na placa de 96 poços de 100 µL + 100 µL caldo BHI na mesma concentração de *C.albican*s em diferentes diluições de biotina após 24 horas em estufa a 37ºC.

Figura 2. Teste de Concentração Micbrocididada Mínima (CMM). O ágar Sabouraud foi dividido em 8 partes, onde em cada uma delas foi semeado 10 µL do preparo da microdiluição anterior e encubado por 24 horas em estufa a 37ºC.



O presente estudo teve por objetivo a avaliação da eficácia de um novo fármaco no tratamento de candidoses especificamente a biotina manipulada em pó, e através dos testes

DOI: 10.51161/conamic2024/30334

identificar se existe possível efeito inibitório em colônias cultivadas de *Candida albicans* a fim de buscar novas alternativas terapêuticas de tratamento em infecções causadas por esse microorganismo.

A partir dos testes de sensibilidade *in vitro* de colônias isoladas de *Candida albicans* realizados com administração de biotina esperava-se que o fármaco manipulado apresentasse ação antifúngica sobre colônias planctônicas e biofilme de *Candida albicans* a fim de contribuir com as linhas de pesquisa de candidoses na área de micro e micologia clínica que buscam através da técnica de reposicionamento de fármacos fazer a introdução de novos produtos de amplo espectro no mercado que sejam seguros, eficazes, e que apresentem baixa ou nenhuma toxicidade para as células humanas.

A técnica de reposicionamento de fármacos baseia-se na ideia de que muitos medicamentos aprovados com perfis de segurança, farmacocinética e mecanismos de ação já conhecidos possam ser aproveitados para explorar novas alternativas de tratamento de infecções para além do seu alvo original. Ademais, esse é o primeiro experimento que envolve a técnica de reposicionamento de fármaco através de biotina para fins terapêuticos relacionados a fungos, especificamente a colônia de *Candida albicans*, já que esse fármaco geralmente é comercializado para fins de tratamento de queda de cabelo e fortalecimento de unha manipulada juntamente com outras vitaminas importantes para a saúde.

Segundo Célia, A. et,al; 2022, infecções fúngicas são uma das principais causas de mortes relacionadas a doenças infecciosas em todo o mundo. As espécies de *Candida* são um dos agentes causadores mais comuns de infecções fúngicas invasivas, predominando a *Candida albicans* como a principal causa de candidíase invasiva. Como os fungos são eucariontes assim como o hospedeiro humano, o número de moléculas alvos que podem ser explorados para o desenvolvimento de novos antifúngicos é ainda limitado.

No experimento realizado no laboratório do Instituto Taubaté de Ensino Superior observou-se que não houve taxa de resposta positiva entre as colônias de *Candida albicans* que receberam a biotina manipulada em meio de cultivo BHI. Esses resultados demonstram os quão resistentes e oportunistas esses fungos podem ser, o que ressalta ainda mais a importância de novos testes de fármacos já disponíveis na indústria farmacêutica pra fins terapêuticos de candidoses, já que muitas das vezes esses fármacos são utilizados sem indicação médica, como por exemplo, os fármacos pertencentes á classe do fluconazol, isso faz com que haja perca de eficácia nos tratamentos em longo prazo.

4 CONCLUSÃO

Verificou-se através do presente trabalho que a administração de biotina pura sem excipientes manipulada não exibiu atividade antifúngica em colônias de *Candida albicans.*

Finalmente, estudos futuros com outros fármacos e colônias de microorganismos serão esclarecedores para se determinar perfis de resistência não somente do gênero *albicans* aqui retratado, mas de quaisquer outros microorganismos causadores de infecções que são caso de saúde pública ao redor do mundo. Ademais, a biotina também pode ser testada para prever possível resposta antimicrobiana e inibitória de outros gêneros de fungos e bactérias não testados no presente estudo.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. et al. Avaliação da suscetibilidade de diferentes espécies de *Candida sp* a antifúngicos e Dimetil sulfóxido. Disponível em: https://ww.scielo.br/j/jbpml/a/9wVhDGbcJm4CJK36jykkv7H/. Acesso em 22 de março de 2023.

DOI: 10.51161/conamic2024/30334

FERNANDEZ, C. M. A. et al. Sensibilidad in vitro de cepas de Candida frente a fluconazol y anfotericina B. Rev Cubana Med Trop, Ciudad de la Habana, v. 59, n. 2, agosto de 2007. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602007000200007&lng=es&nrm=iso>. Acesso em 09 março de 2023.

GARBERS, L. E. F. de M. Avaliação do crescimento ungueal: comparação entre biotina e minoxidil tópico / Luiz Eduardo Fabricio de Melo Garbers. - Botucatu, 2019. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/190928>.

GEWEHR, d. m.; bandeira, v. a. c.; de oliveira, k. r. & colet, c. d. f. (2015). Possíveis riscos relacionados a vitaminas e polivitamínicos comercializados em uma drogaria do município de Ijuí/rs. Salão do conhecimento. Disponível em: https://www.publicacoeseventos.unijui.edu.br/index.php/salaoconhecimento/article/view/4621. Acesso em 17 de maio de 2023.

MOTTA, F. A., Dalla-Costa, L. M., Muro, M. D., Cardoso, M. N., Picharski, G. L., Jaeger, G., & Burger, M.. (2017). Risk factors for candidemia mortality in hospitalized children. Jornal De Pediatria, 93(2), 165–171. https://doi.org/10.1016/j.jped.2016.05.007

PARUMS, D. V. (2022). Editorial: The World Health Organization (WHO) Fungal Priority Pathogens List in Response to Emerging Fungal Pathogens During the COVID-19 Pandemic. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 28, e939088. https://doi.org/10.12659/MSM.939088. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241. Acesso em 23 de maio de 2023.

RIVERO. Estudio de la formación de la biopelícula de Candida spp. y evaluación de nuevas combinaciones farmacológicas. 2017. Disponível em: https://dadun.unav.edu/bitstream/10171/43758/1/Tesis_FernandezRivero.pdf.Acesso em 12 de abril de 2023.

ROCHA, W. R. V. da; NUNES, L. E. .; NEVES, M. L. R. .; XIMENES, E. C. P. de A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. de A. Candida genus - Virulence factores, Epidemiology, Candidiasis and Resistance mechanisms. Research, Society and Development, [S. l.], v. 10, n. 4, p. e43910414283, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i4.14283. Disponível em: https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/14283. Acesso em: 10 apr. 2023.

SILVA, et al. Morfologia, epidemiologia e virulência de espécies do gênero Candida. Disponível em Tópicos nas ciências da saúde, vol. VII, página 42, editora Pantanal, 2021. Disponível em: https://editorapantanal.com.br/ebooks/2021/topicos-nasciencias-da-saude-volume-vii/Cap4.pdf. Acesso em 12 de março de 2023.

VIEIRA; NASCIMENTO. Resistência a Fármacos Antifúngicos por Candida e Abordagem Terapêutica. 04 de julho de 2017. Disponível em: https://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/3379120

VIERA; SANTOS. Mecanismos de resistência de Candida albicans aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. Página 235, 2017. Disponível em: https://www.rbac.org.br/artigos/mecanismos-de-resistencia-de-candida-albicans-aosantifungicos-anfotericina-b-fluconazol-e-caspofungina/. Acesso em 22 de março de 2023

ZEMPLENI, J.; Wijeratne, S. S.; Hassan, Y. I. Biotin. Biofactors. 2009; 35(1):36-46. doi:10.1002/biof.8 Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19319844/. Acesso em 12 de maio de 2023.

DOI: 10.51161/conamic2024/30334