UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

O uso de probióticos e suas biomoléculas na saúde de animal de produção

Dra. Sabrina da Silva Sabo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF/USP

Supervisão: Prof. Ass. Ricardo Pinheiro de S. Oliveira

São Paulo
22 de outubro de 2018

Plano de apresentação

1. Histórico profissional

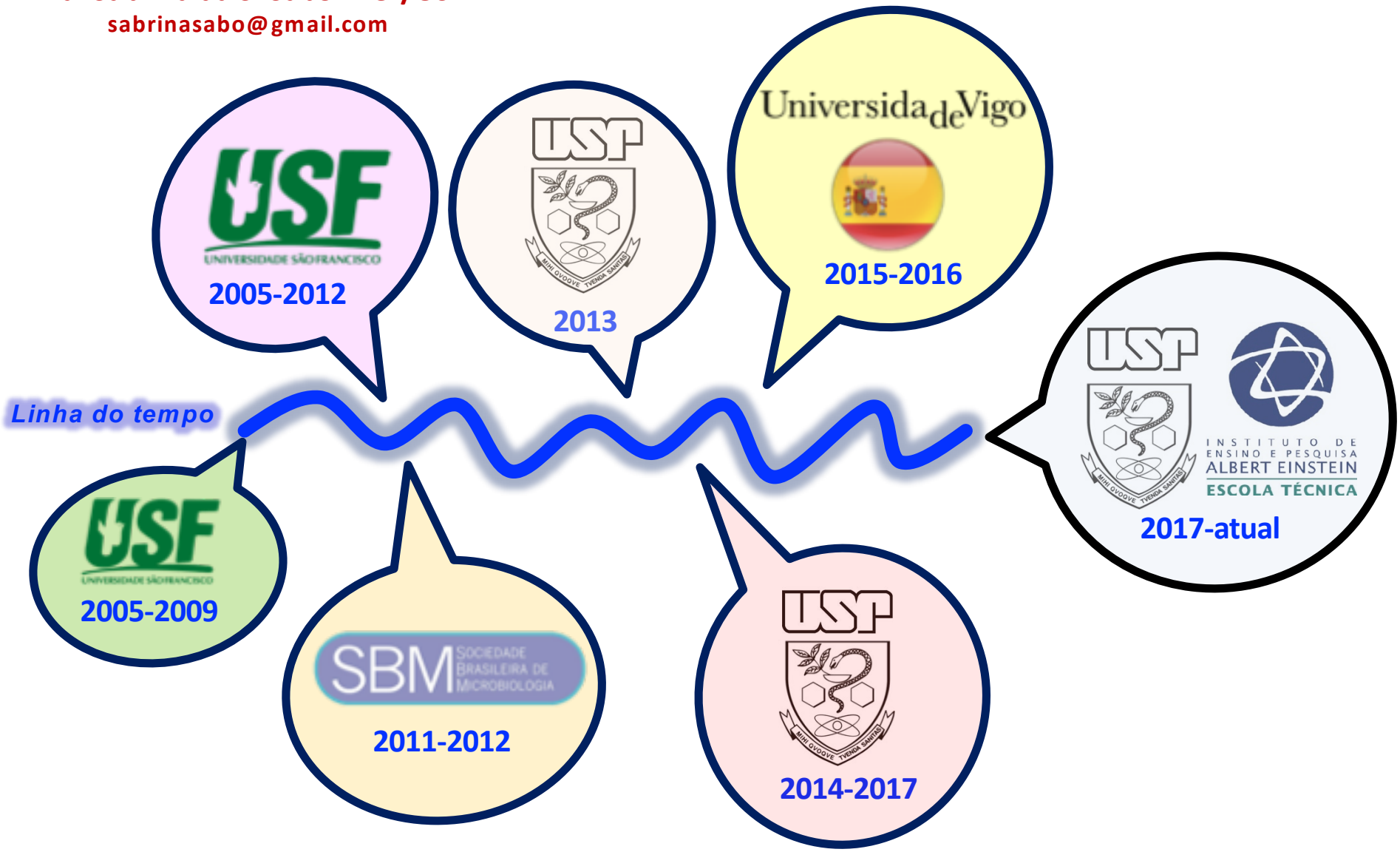
2. Contextualização do problema

3. Definições sobre probióticos

4. Minha experiência... Projeto Pós-Doutorado

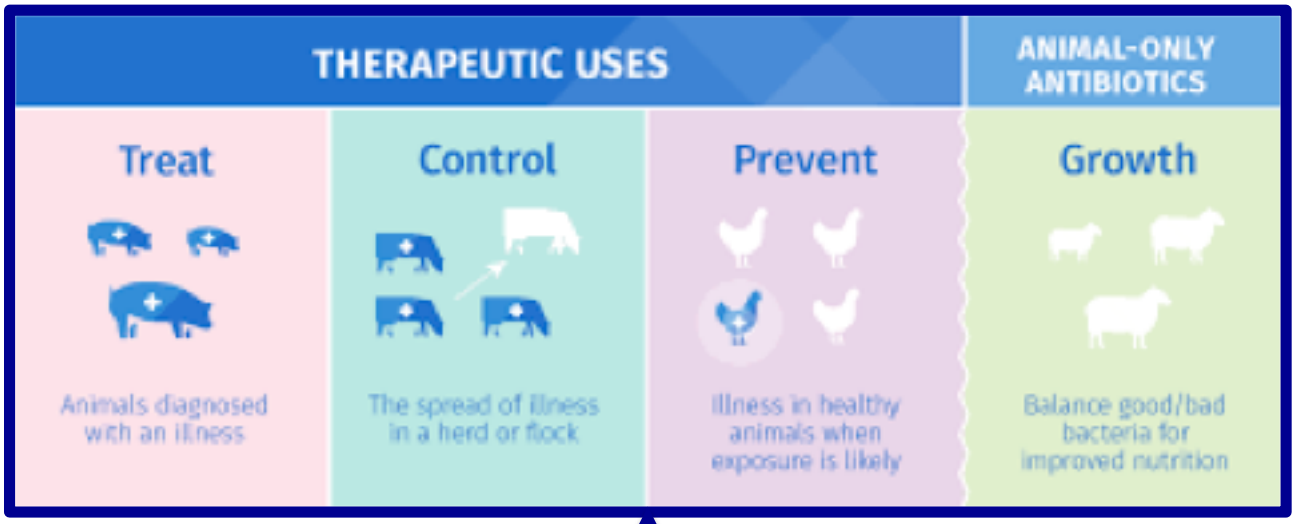
1. Histórico Profissional

Dra. Sabrina da S. Sabo– FCF/USP
sabrinasabo@gmail.com

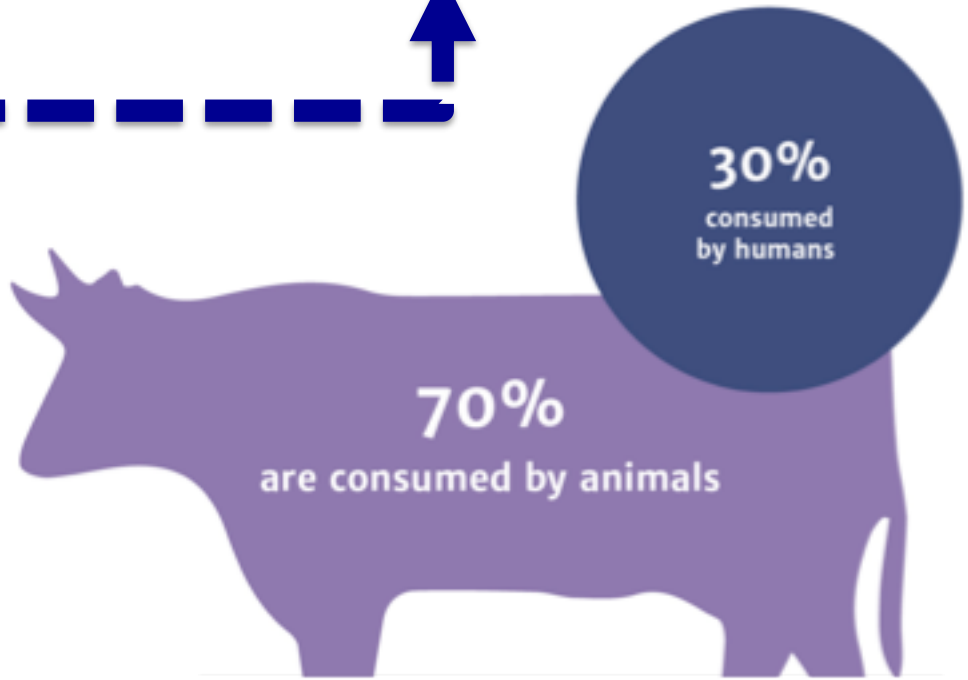


Contextualização do problema

Antibióticos *vs.* Agricultura



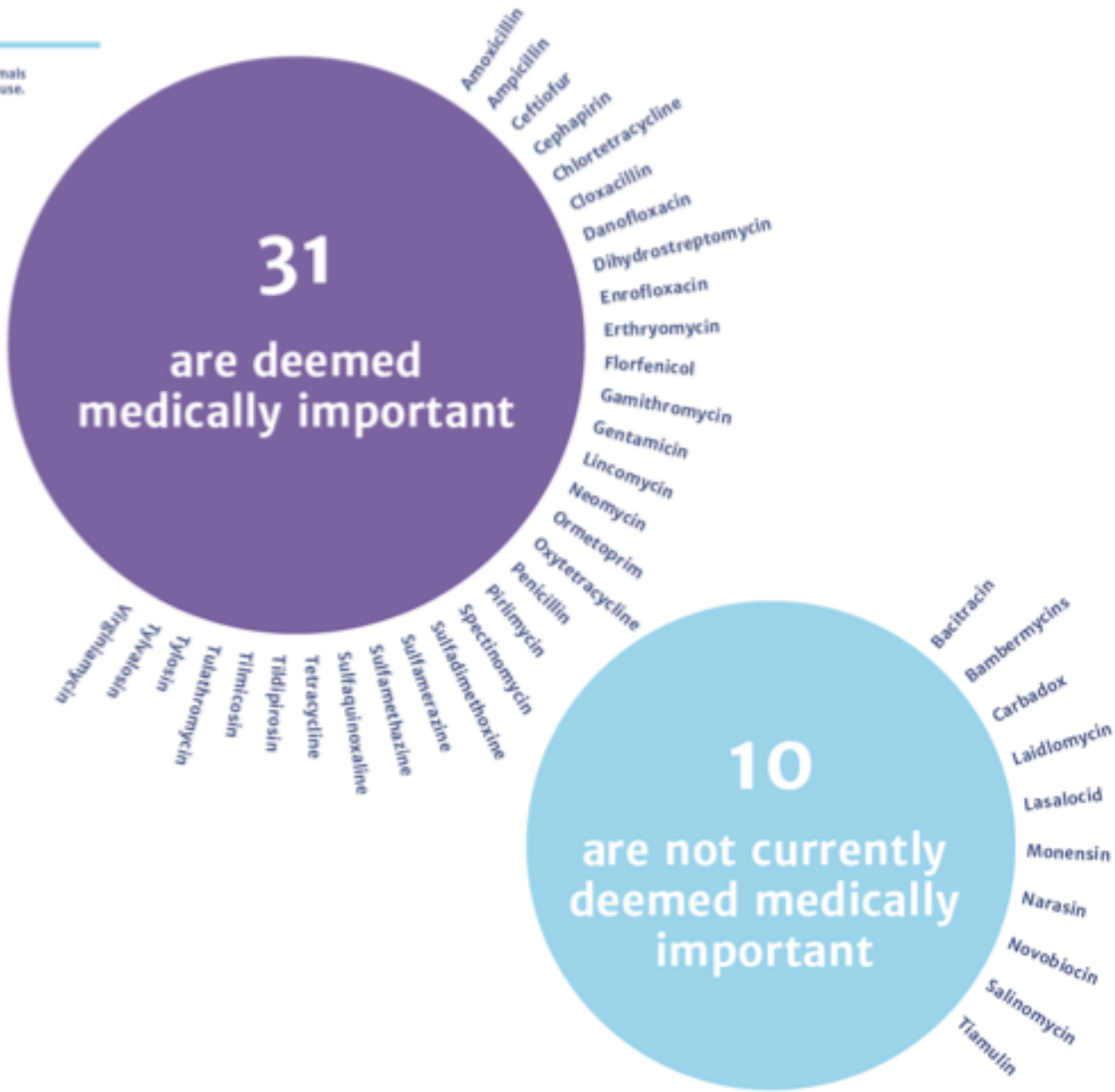
O uso de antibióticos em animais originou-se há mais de 70 anos, quando a ***clortetraciclina*** comprovou melhorar o crescimento e a saúde de aves (Moore et al., 1946).



ANIMALS IN THE USA CONSUME MORE THAN TWICE AS MANY MEDICALLY IMPORTANT ANTIBIOTICS AS HUMANS

MOST ANTIBIOTICS USED IN ANIMALS ARE MEDICALLY IMPORTANT FOR HUMANS

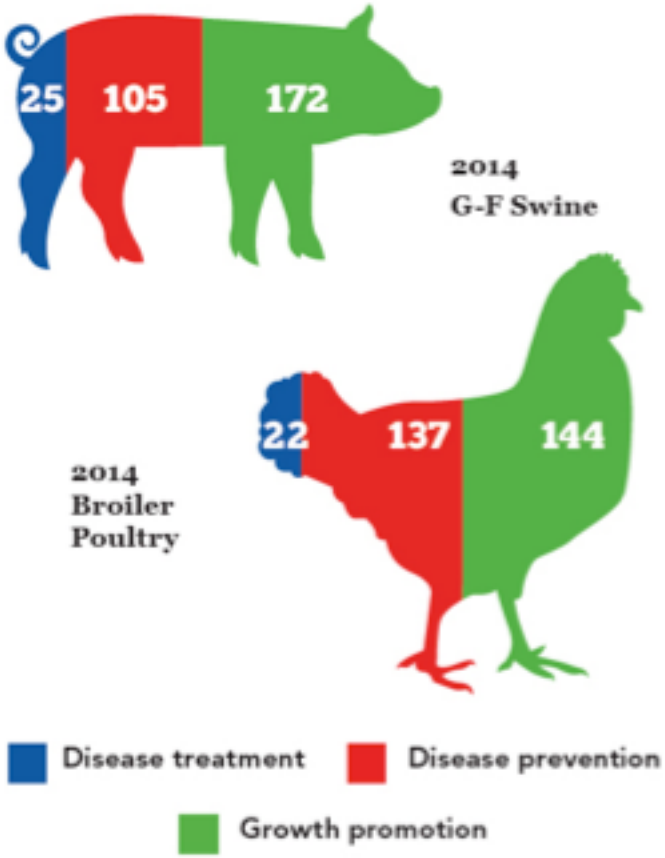
Of the 41 antibiotics* that are approved for used in food producing animals by the FDA, 31 are categorised as being medically important for human use.

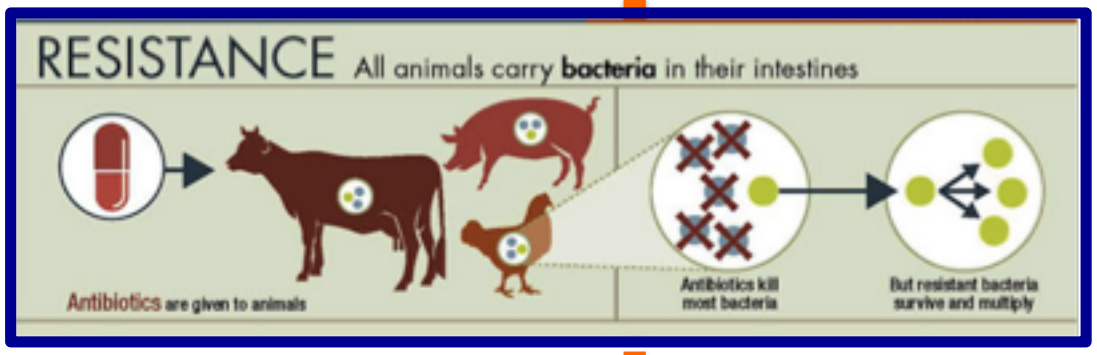


MOST PUBLISHED PAPERS PROVIDE EVIDENCE TO SUPPORT LIMITING USE OF ANTIBIOTICS IN AGRICULTURE

- Primeira evidência – Dinamarca (1995): proibição da avoparcina, quimicamente relacionada com a vancomicina - redução na prevalência de enterococos resistentes à vancomicina. **De 72% em 1995 para 2% em 2005.**

- Recentemente (2016): restrição à colistina – decorrente ao relato de pesquisadores chineses que identificaram o gene *mcr-1* em Enterobactérias isoladas de animais, alimentos e humanos.





- Genes de resistência entre bactérias de animais e microbiota de humanos

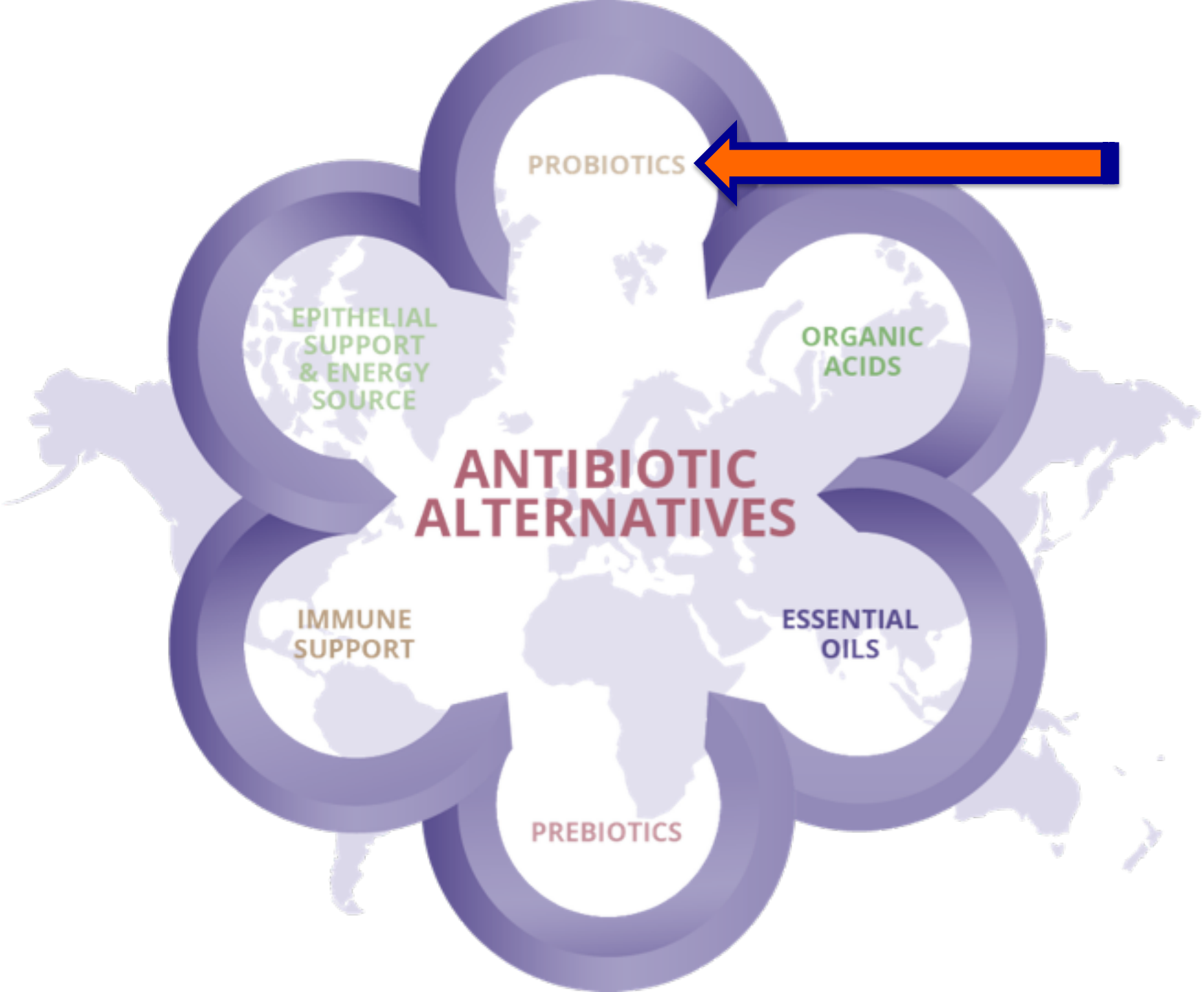
Ban of all food animal growth-promoting antibiotics by Sweden in 1986.

EU countries banned specific antibiotics in feedstuffs.

January 1, 2006, all antibiotics were deleted from the Community Register of authorized feed additives – EU.

Seguindo as recomendações das agências internacionais, no Brasil, o MAPA, restringiu, desde 1998, o uso de alguns antibióticos.

Mas.... determinadas substâncias já banidas pela Comissão da União Europeia, como por exemplo, a tilosina, avilamicina, virginiamicina e bacitracina de zinco, continuam sendo utilizadas.


PROBIOTICS
EPITHELIAL SUPPORT & ENERGY SOURCE
ORGANIC ACIDS
ANTIBIOTIC ALTERNATIVES
IMMUNE SUPPORT
ESSENTIAL OILS
PREBIOTICS

O que são probióticos?

O que são probióticos?

PRO = Promoting **BIOTIC = Life**

1865

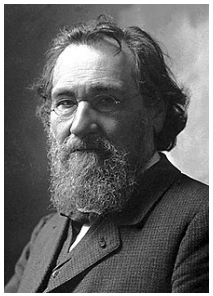
Lilly e Stillwell – ***substâncias*** promotoras de crescimento produzidas por um protozoário ciliado que estimulou o crescimento de outro ciliado.

1874

Parker definiu os probióticos como "organismos e ***substâncias*** que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal", incluindo assim tanto organismos vivos quanto substâncias não-vivas.

1989

1907



Élie Metchinikoff, notou a longevidade dos búlgaros que consumiam iogurte - as bactérias nativas eram prejudiciais e a ingestão de bactérias lácticas no iogurte influenciava positivamente a saúde.

O Fuller redefiniu os probióticos como "um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta beneficamente o animal hospedeiro, melhorando seu equilíbrio microbiano intestinal".

2001

Aceitação pela Organização de Agricultura Alimentar (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS)

“Os probióticos são microrganismos *vivos* que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem uma série de *benefícios* à saúde do hospedeiro”

(FAO/WHO, 2011).

Nutrição animal - 1989

FDA adotou o termo "direct-fed microbials" – "fonte de micro-organismos vivos".

Probiotics *and* ***direct-fed microbials*** *are accepted by regulatory agencies to designated animals supplementation composed of live micro-organisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host* (FAO, 2016).

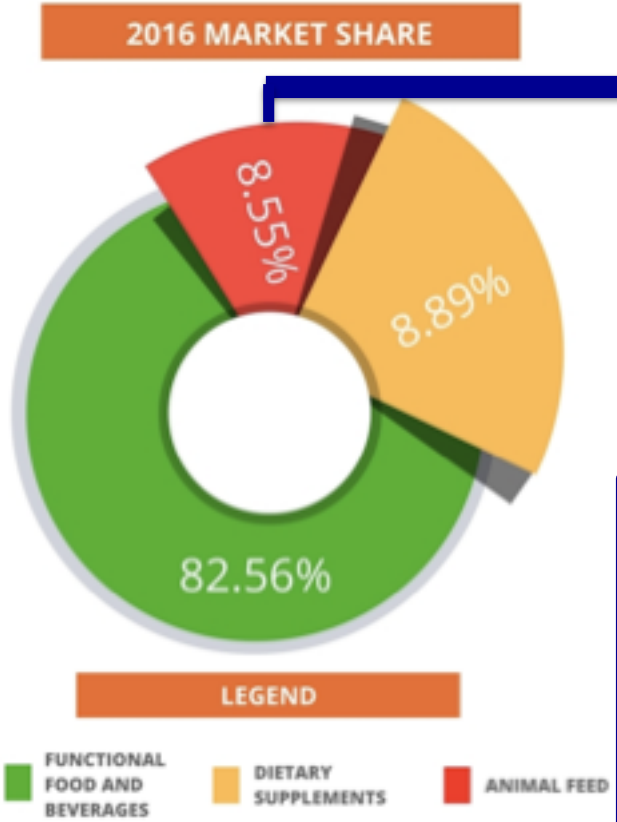
Top Companies

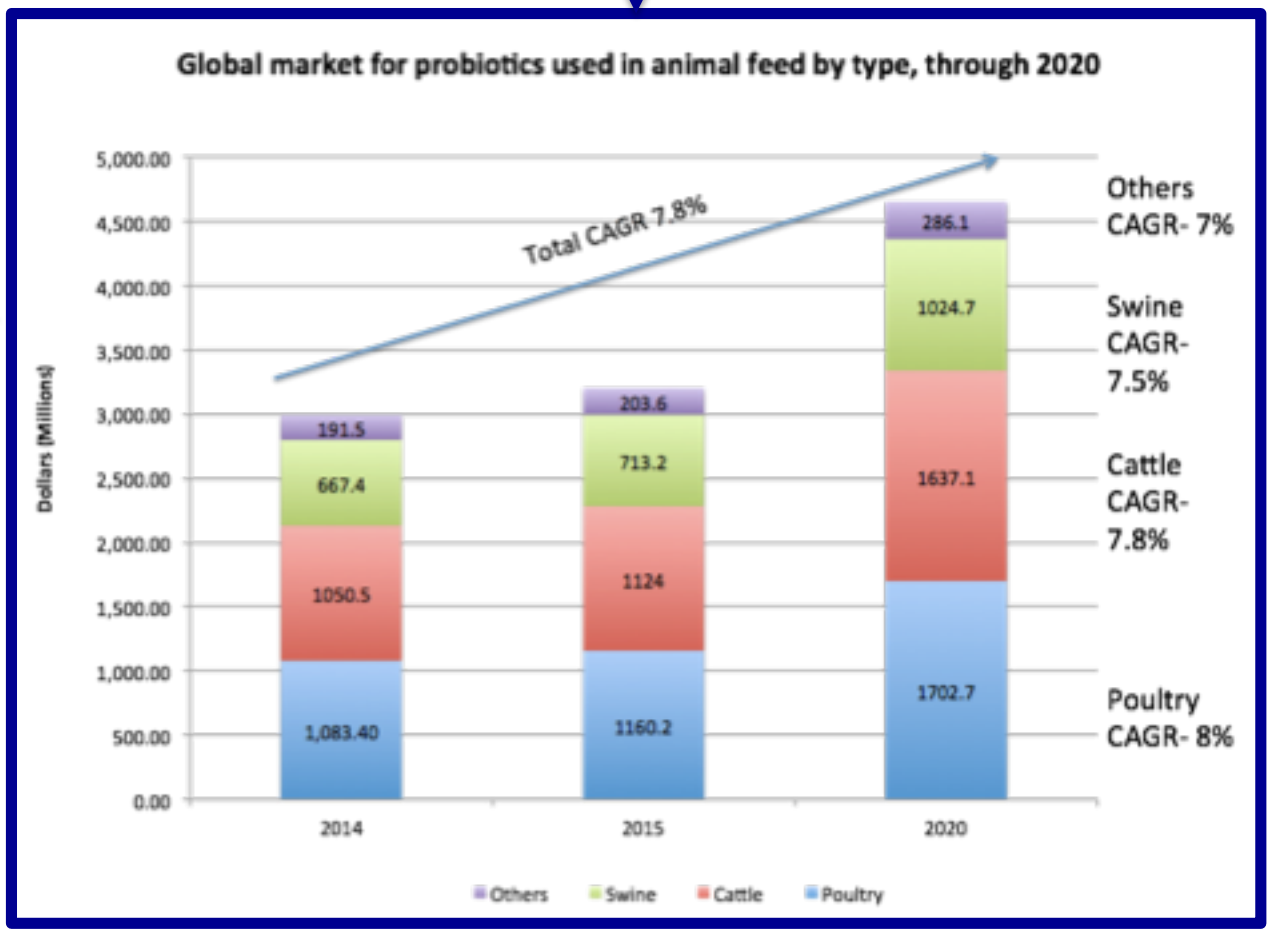
- Christian Hansen
  - GalliPro
  - PoultriMax
- Lallemand
  - Levucell
  - Bactocell
- Biomin
  - PoultryStar

Poultry

Swine

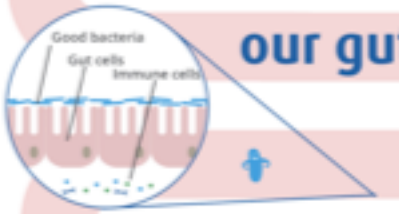
Cattle


2016 MARKET SHARE
8.55%
8.89%
82.56%
LEGEND
FUNCTIONAL FOOD AND BEVERAGES
DIETARY SUPPLEMENTS
ANIMAL FEED

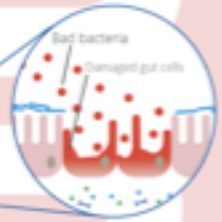

Global market for probiotics used in animal feed by type, through 2020
Dollars (Millions)
5,000.00
4,500.00
4,000.00
3,500.00
3,000.00
2,500.00
2,000.00
1,500.00
1,000.00
500.00
0.00
Total CAGR 7.8%
191.5
667.4
1050.5
1,083.40
203.6
713.2
1124
1160.2
286.1
1024.7
1637.1
1702.7
2014
2015
2020
Others CAGR- 7%
Swine CAGR- 7.5%
Cattle CAGR- 7.8%
Poultry CAGR- 8%
Others
Swine
Cattle
Poultry

Quais os benefícios?

We have around 40,000,000,000,000 bacteria in our gut.



What causes an imbalance of good & bad bacteria?



FOR PROFESSIONAL USE ONLY

The gut is home to trillions of **friendly bacteria** which are fundamental to our health!

PROBIÓTICOS

An imbalance in good / bad bacteria

Lifestyle factors such as ***age, stress, poor diet, antibiotics and exotic travel*** can lead to dysbiosis - an imbalance of good and bad bacteria in our gut. This could result in some far reaching effects on our health:

- *Poor digestion*
- *Bloating*
- *Bowel irregularity*
- *Compromised immune function*
- *Inflammation in the gut*

The most important objectives for using probiotics in animal feed are ***to maintain*** *and* ***improve the performance*** *(productivity and growth) of the animal and* ***prevent and control enteric pathogens****.*

Durante o manejo de animais, diversas situações estressantes podem interferir no balanço da microbiota, afetando consequente, a eficiência alimentar, bem-estar e saúde do animal

Table 1. Main targets for probiotics' use in ruminants.

Young ruminants	Dairy cattle	Beef cattle
Promoting optimal maturation of the rumen microbiota	Increasing milk yield and quality	Promoting weight gain
Increasing digestive safety at weaning	Increasing feed efficiency	Increasing feed efficiency
Reducing risk of pathogen colonisation	Promoting health (limit acidosis)	Promoting health (reduce acidosis)
		Limiting shedding of human pathogens

Table 3. Main applications for probiotics' use in pigs.

Gestating sow	Lactating sow and piglets	Fattening pigs
Improve diet digestibility	Improve colostrum quality, milk quality and quantity	Improve feed efficiency
Limit constipation	Increase litter size and vitality	Improve meat quality
Decrease stress	Increase piglet weight	Reduce risk of diarrhoea
	Reduce risk of diarrhoea	

Table 2. Main targets for probiotics' use in equines.

Gestating mares	Foals	Racing horses
Increase diet digestibility	Promote growth	Avoid hindgut disorders (acidosis, colic) and increase digestibility of diet
Improve milk quantity and quality	Limit diarrhoea	Limit stress (transportation, race, etc.)

Chaucheyras-Durand, F., & Durand, H. (2009). Probiotics in animal nutrition and health. Beneficial microbes, 1(1), 3-9.

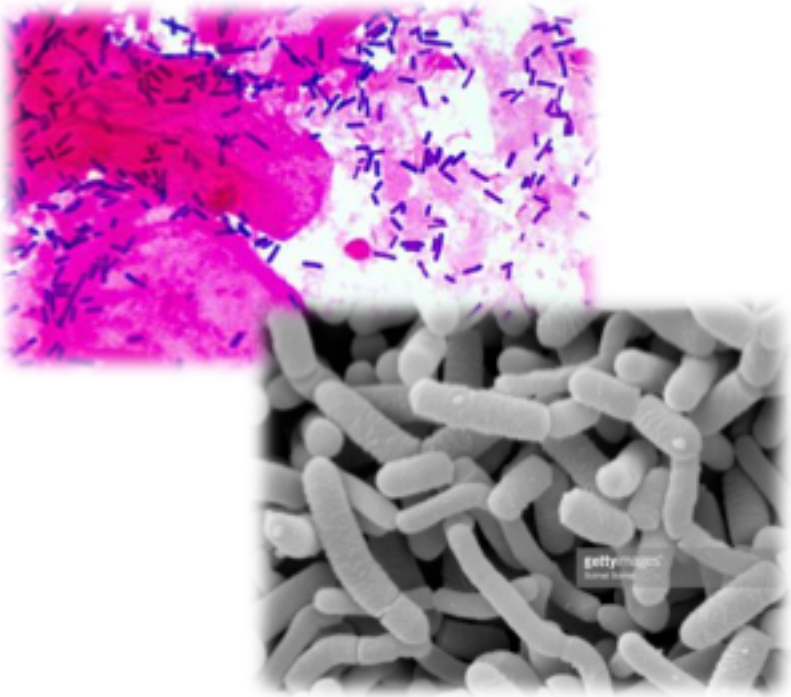
Quem são elas?

TABLE 6
Micro-organisms in the official list of AAFCO that are suitable for use in animal feed

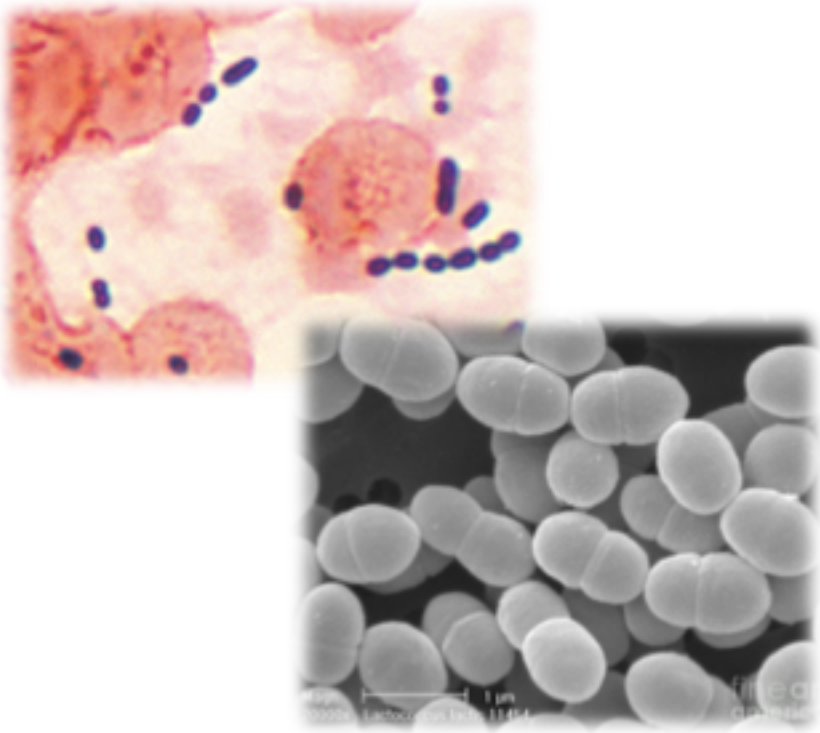
Aspergillus niger	*Bifidobacterium thermophilum*	*Pediococcus acidilacticii*
Aspergillus oryzae	*Lactobacillus acidophilus*	*Pediococcus cerevisiae (damnosus)*
Bacillus coagulans	*Lactobacillus brevis*	*Pediococcus pentosaceus*
Bacillus lentus	*Lactobacillus buchneri* (cattle only)	*Propionibacterium acidpropionici (cattle only)*
Bacillus licheniformis	*Lactobacillus bulgaricus*	*Propionibacterium freudenreichii*
Bacillus pumilus	*Lactobacillus casei*	*Propionibacterium shermanii*
Bacillus subtilis	*Lactobacillus cellobiosus*	*Saccharomyces cerevisiae*
Bacteroides amylophilus	*Lactobacillus curvatus*	*Enterococcus cremoris*
Bacteroides capillosus	*Lactobacillus delbruekii*	*Enterococcus diacetylactis*
Bacteroides ruminocola	*Lactobacillus farciminis* (swine only)	*Enterococcus faecium*
Bacteroides suis	*Lactobacillus fermentum*	
Bifidobacterium adolescentis	*Lactobacillus helveticu*	
Bifidobacterium animalis	*Lactobacillus lactis*	
Bifidobacterium bifidum	*Lactobacillus plantaru*	
Bifidobacterium infantis	*Lactobacillus reuterii*	
Bifidobacterium longum	*Leuconostoc mesenter*	

Source: Pendleton, 1998

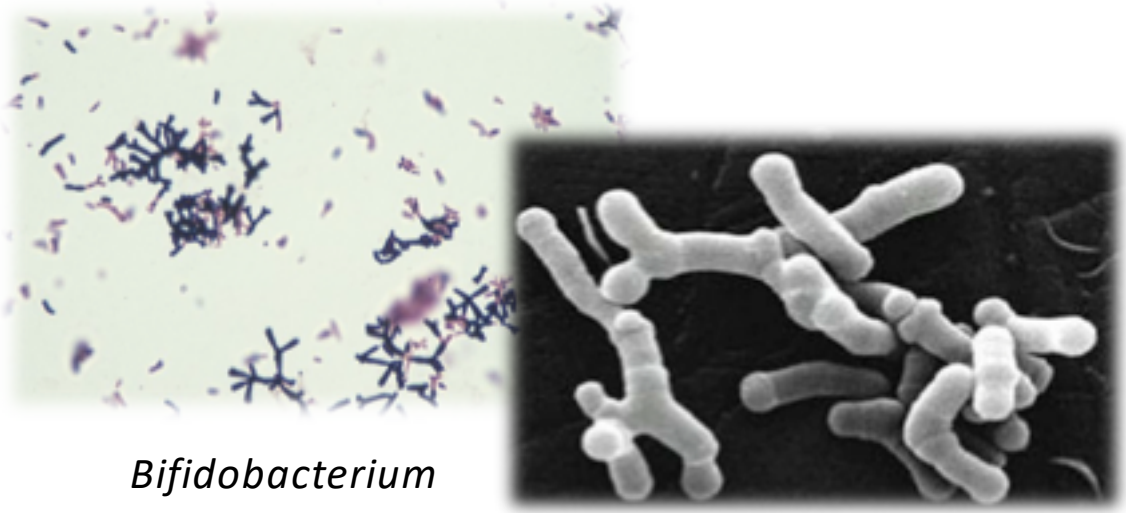
Os probióticos usualmente utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêuticas são os pertencentes ao grupo de *bactérias ácido-láticas*.



Lactobacilos



Lactococcus



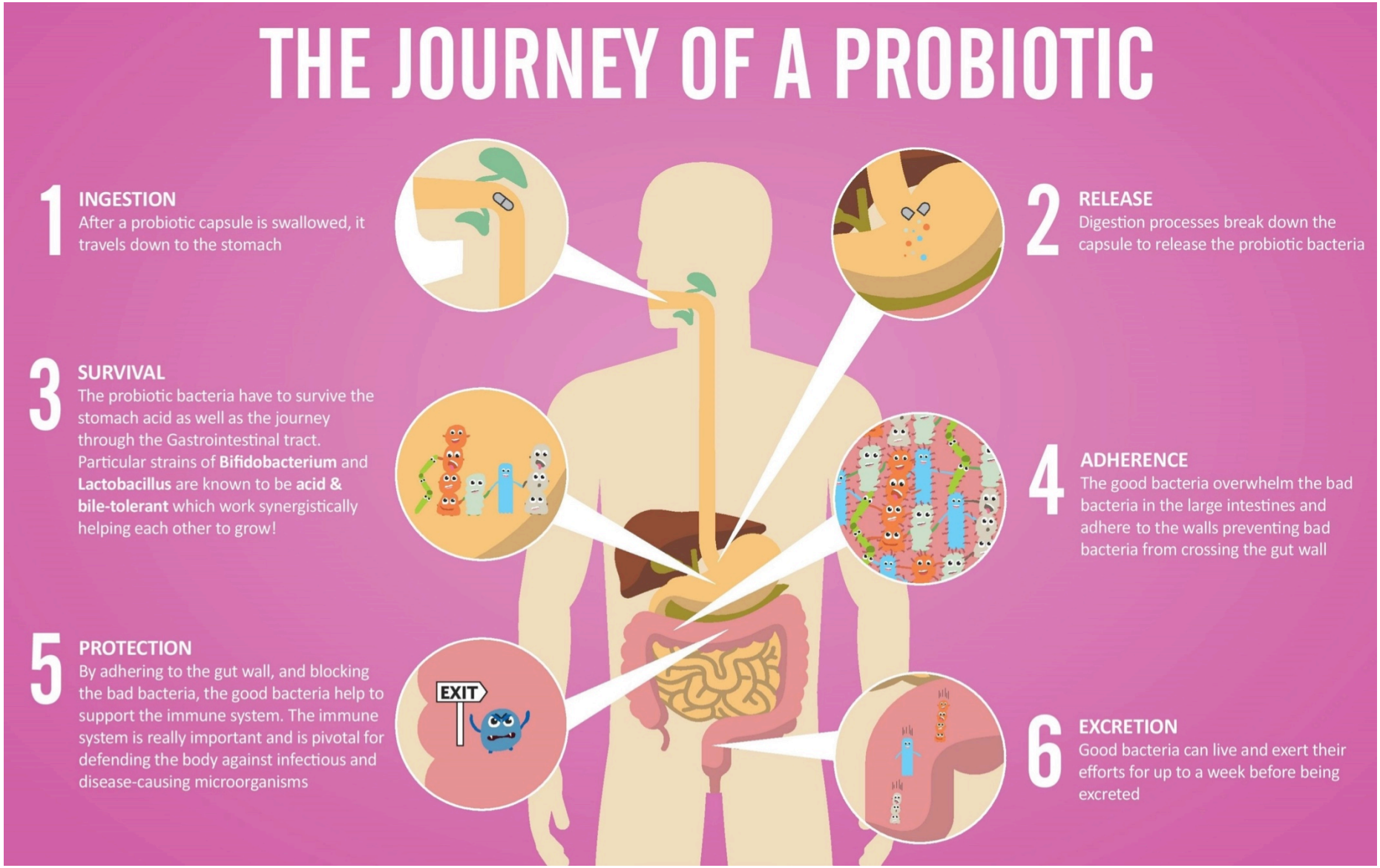
Bifidobacterium

Morfologia celular

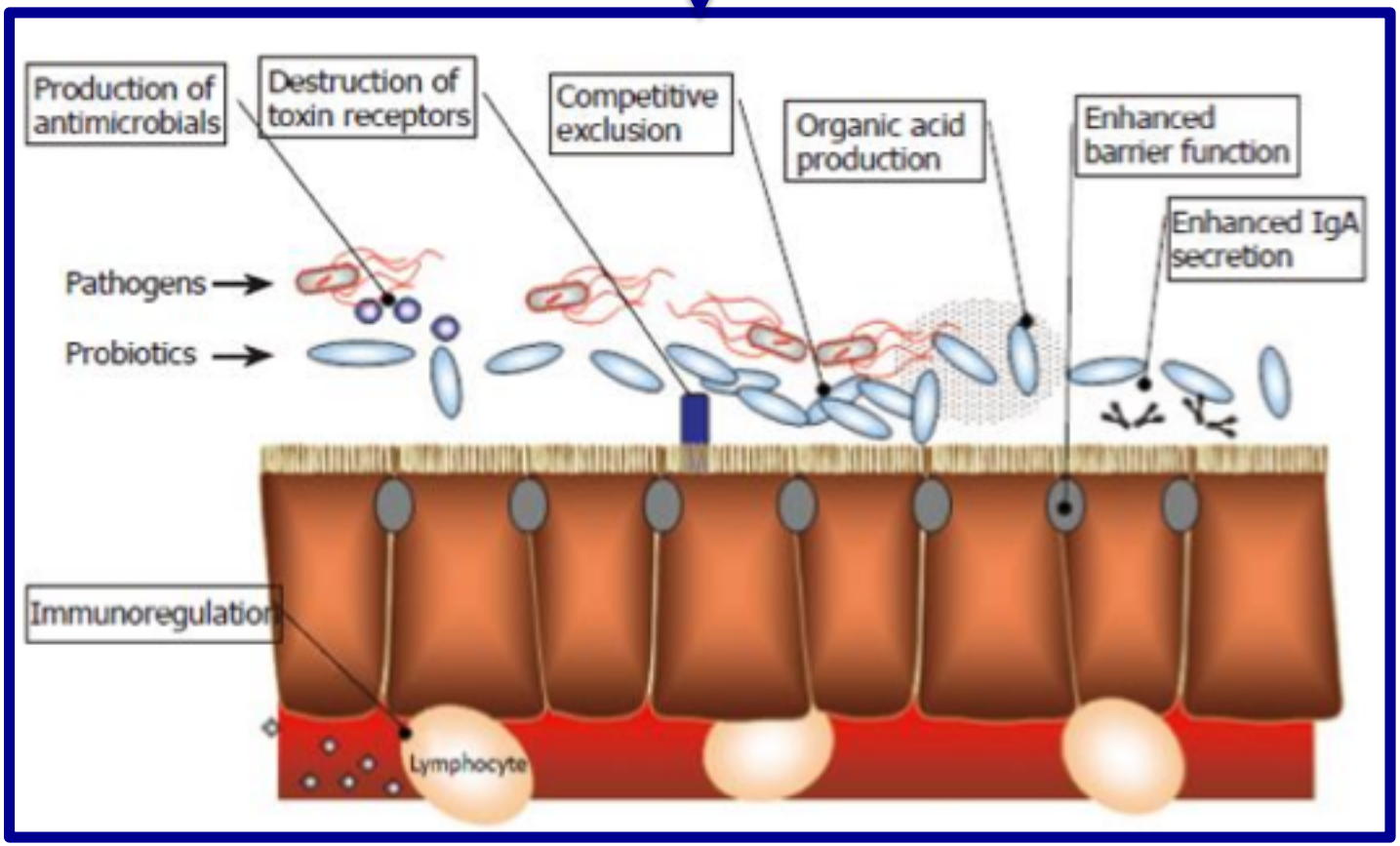
Probióticos comerciais destinados à suplementação da alimentação de aves.

Produto	Micro-organismos da composição	Empresa
Pedioflora Aves	*Pediococcus acidilactici* MA 18/5	Biovet
Levucell SB 20	*Saccharomyces cerevisiae boulardii* CNCM I 1079	Biovet
GalliPro® Max	*Bacillus licheniformis*	Chr. Hansen
PoutriMax®	*Lactobacillus acidophilus*	Chr. Hansen
	Propionibacterium freudenreichii	
Avisflora	*Lactobacillus plantarum*	Kera
	Pediococcus acidilactici	
PoutriStar®	*Enterococcus* (espécie não relatada)	Bioamin
	Pediococcus (espécie não relatada)	
	Lactobacillus (espécie não relatada)	
	Bifidobacterium (espécie não relatada)	
Colostrum BS®	*Bacillus subtilis* (LFU 160) Levedura seca de cana de açúcar	Biocamp
Colostrum Bio 21 Mix®	*Bacillus subtilis* *Enterococcus faecium* (6 cepas) *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus delbrueckii* *Lactobacillus plantarum* (3 cepas) *Lactobacillus reuteri* (5 cepas) *Lactobacillus salivarius* *Pediococcus acidilactici* (3 cepas)	Biocamp

Como funcionam?

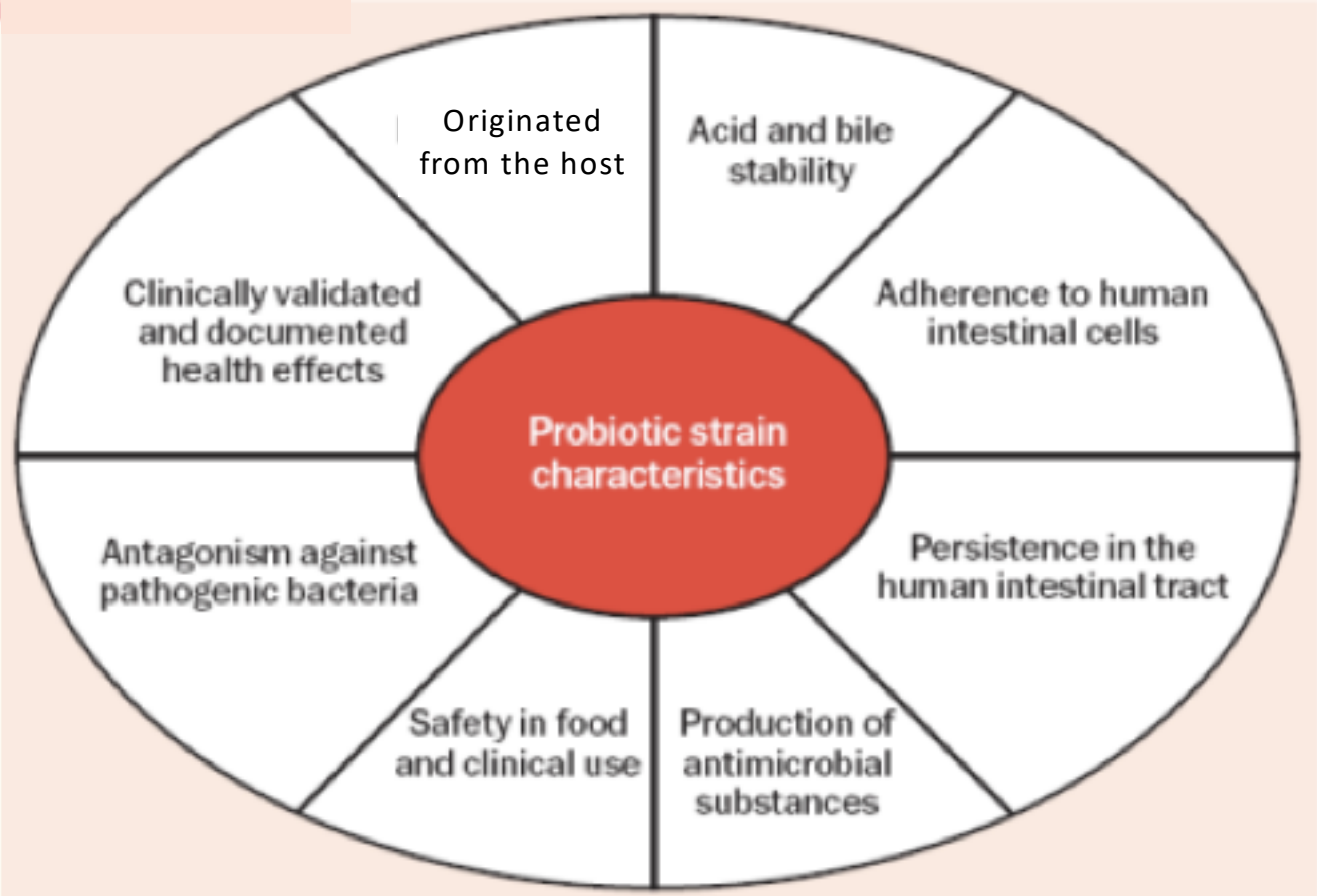


Como funcionam?



Critérios de seleção

Em 2010, a organização *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* emitiu um relatório no qual estabelece critérios para considerar uma cepa probiótica.

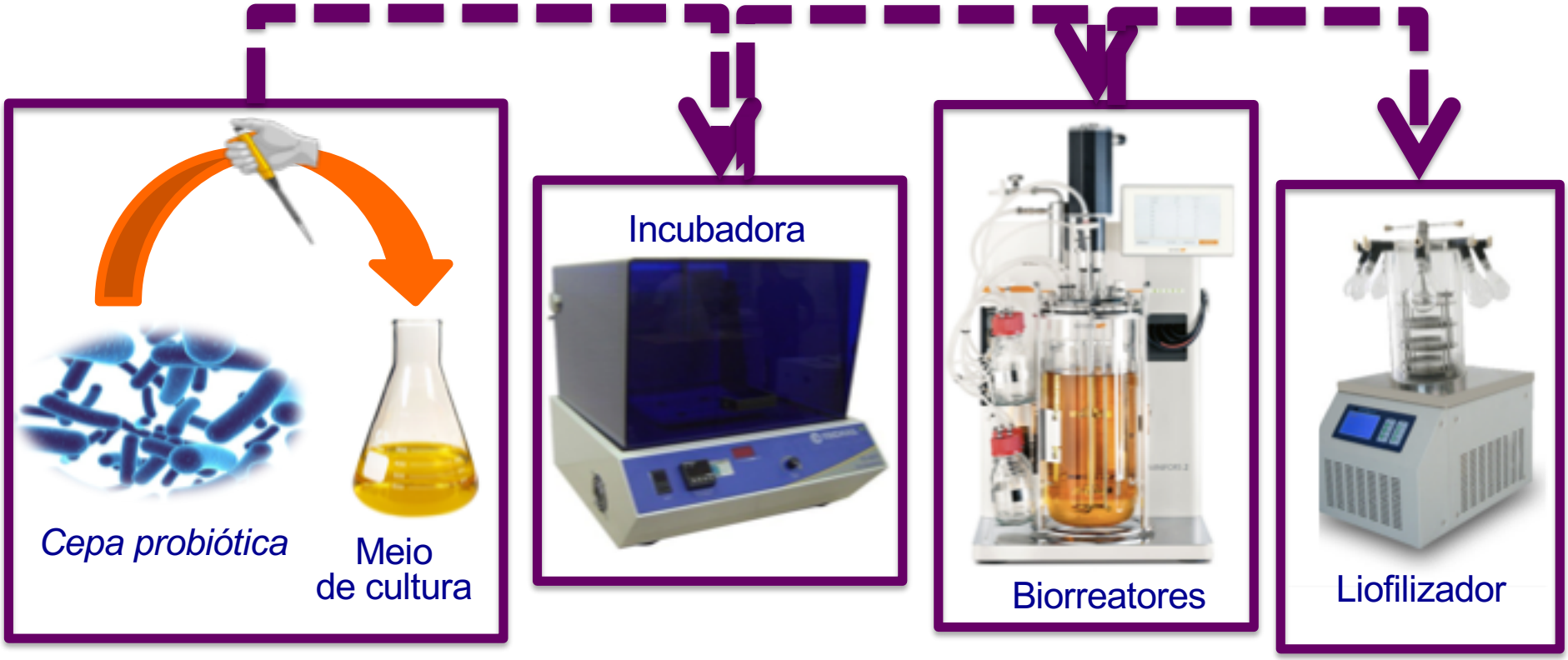


Não competir com micro-organismos da microbiota.

Tolerar os processos de fabricação, transporte, armazenamento e aplicação, mantendo a sua viabilidade e características desejáveis

Como cultivá-las?

Probiotic microorganisms are generally produced by a fermentation process with species temperature and pH, and mostly dried by a freeze-drying or spray drying process. Growth in inexpensive media is important for commercial production.

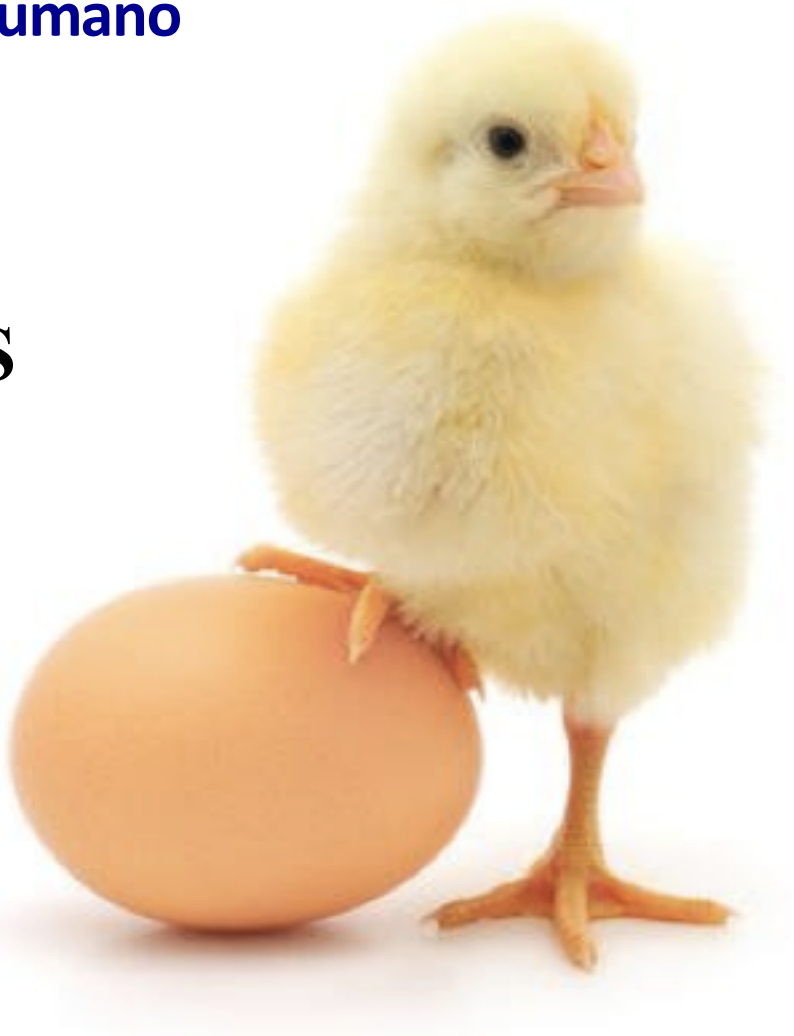


Etapas para desenvolvimento de um probiótico

Minhas experiências

Projeto de Pós-Doutorado

Bioprospecção de bactérias probióticas produtoras de bacteriocinas e vitaminas: uma aplicação como aditivo alimentar em aves para consumo humano

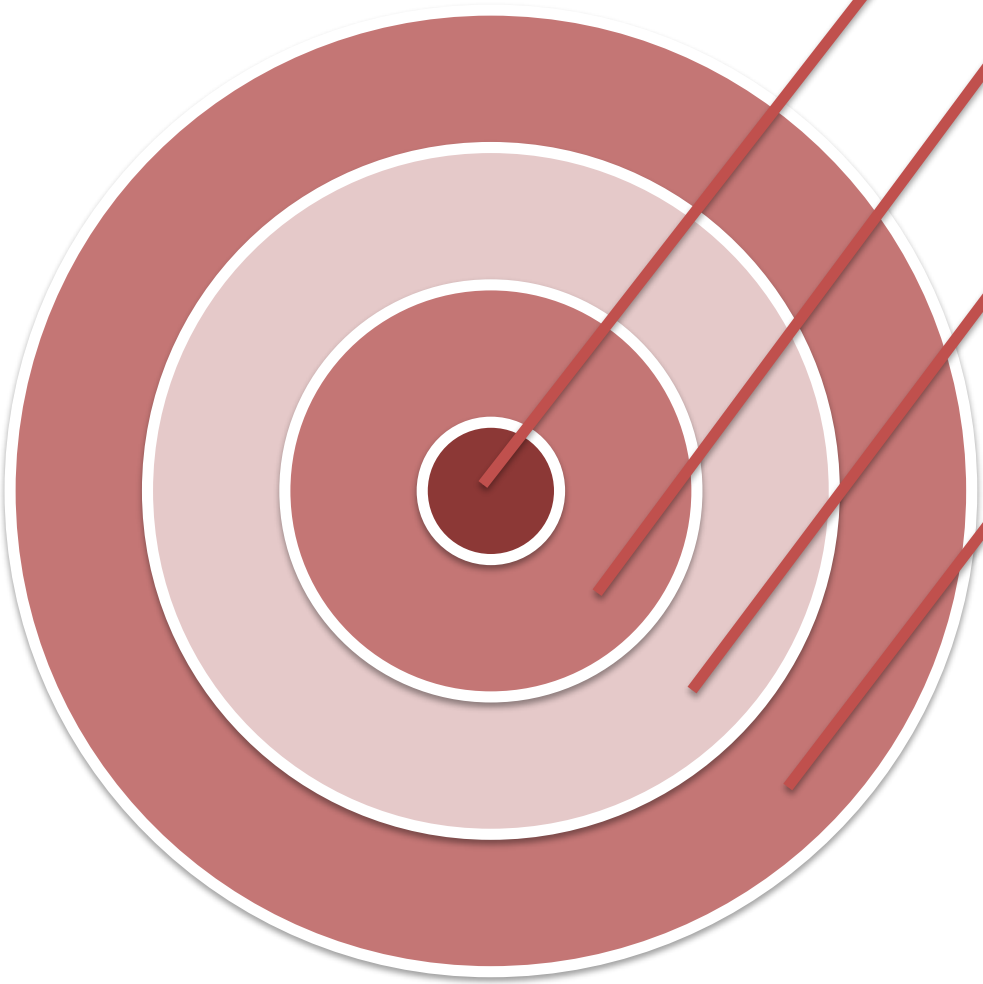


RESULTADOS PARCIAIS

DEZ/2017 – OUT/2018

FAPESP

Objetivos



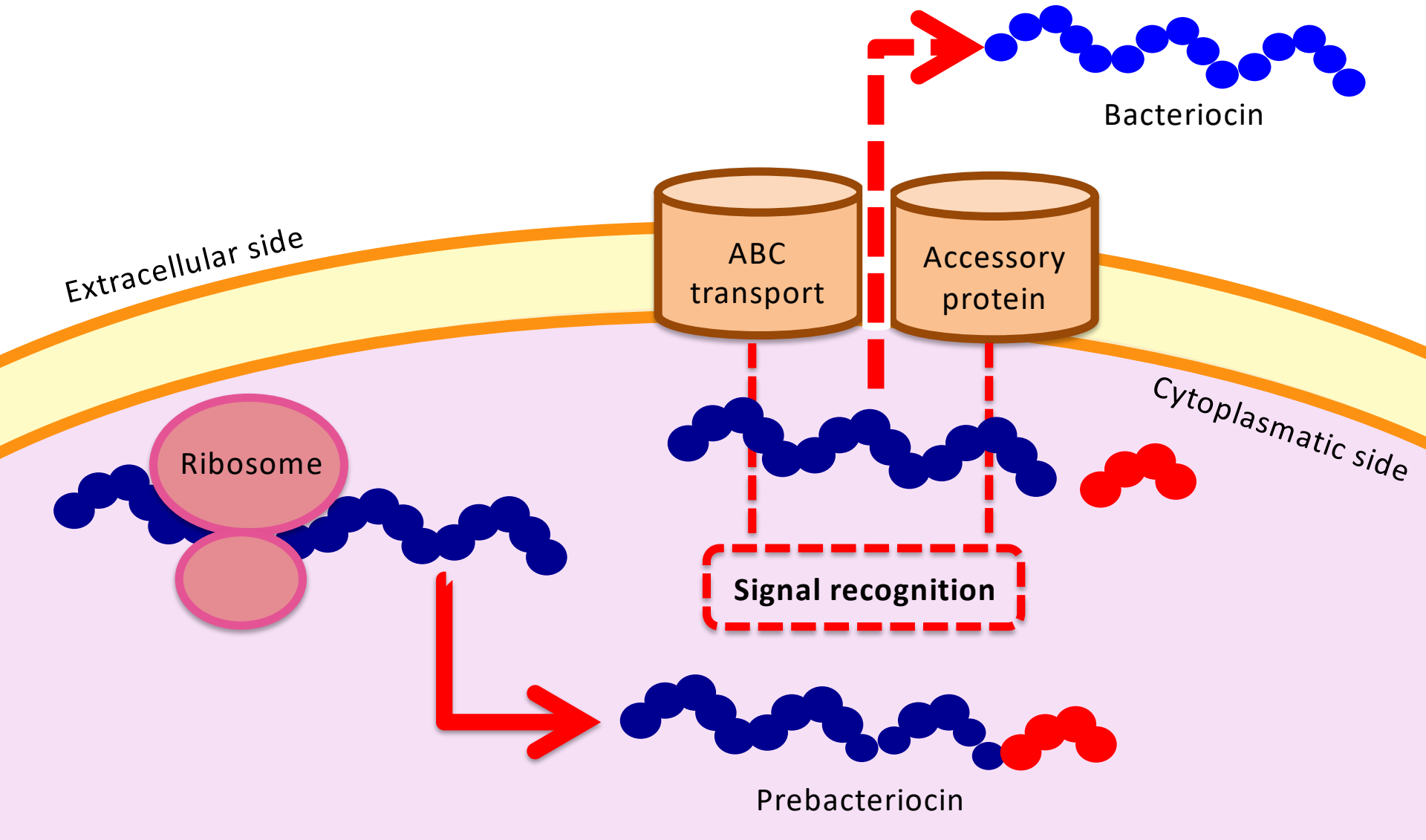
Isolamento das linhagens de BALs probióticas produtoras de vitaminas do grupo B e/ou bacteriocina

Elaboração do “mix” de cepas probióticos.

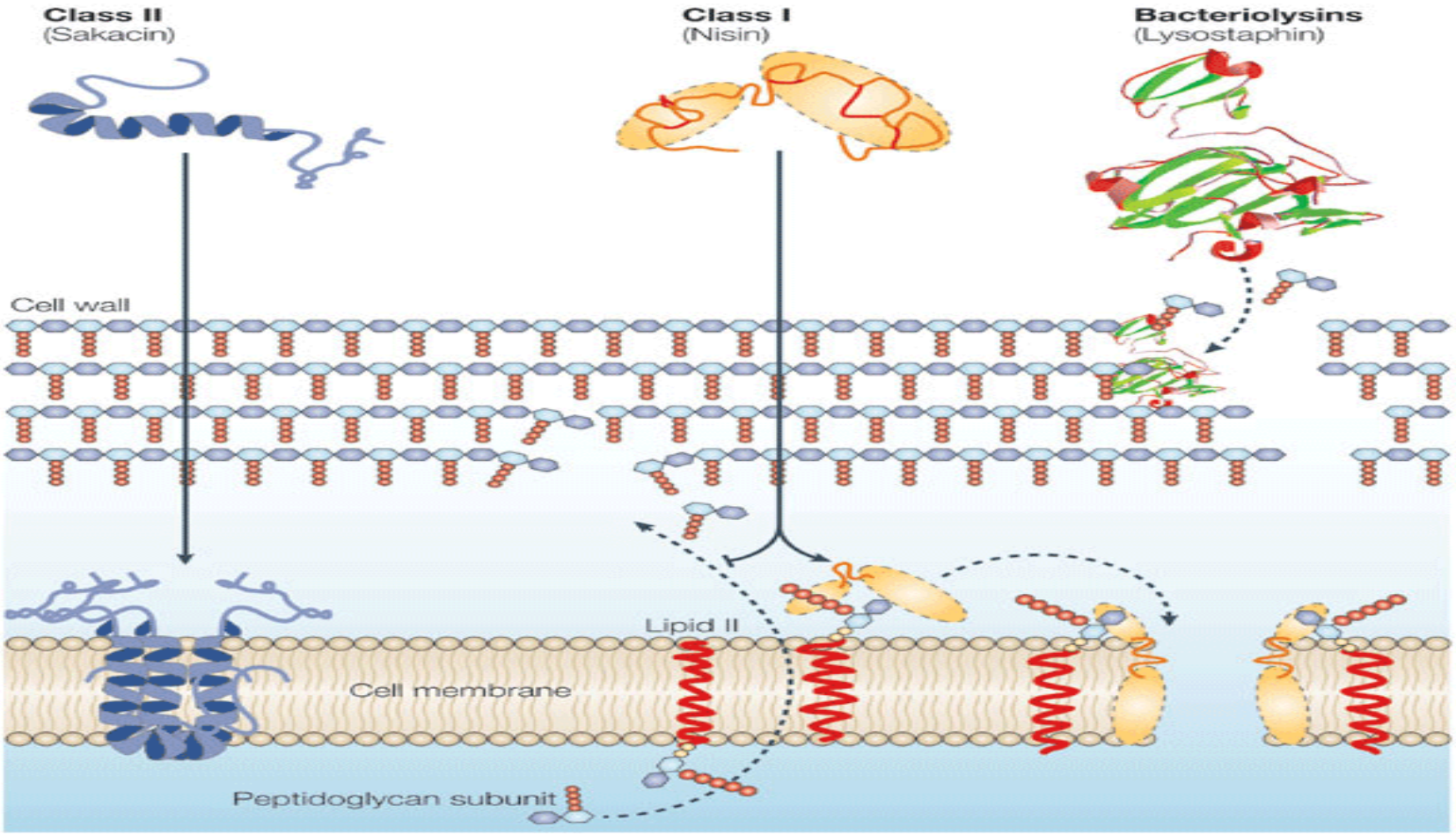
Elaboração de estruturas micro-encapsuladas.

Certificação da eficácia do produto elaborado.

Bacteriocinas



➢ Mecanismos de ação das bacteriocinas



Fonte: Cotter, P. D.; Hill, C.; Ross, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews – Microbiology*, v. 3, p. 777-788, 2005.

➢ Vitaminas do complexo B

RIBOFLAVINA – cofator de diversos sistemas enzimáticos no corpo – reação de oxidação-redução na respiração celular.

ÁCIDO FÓLICO – requerido para o metabolismo de ácidos nucléicos e formação de proteínas que participam da multiplicação celular.

Coleta de conteúdo em apêndice cecal de ave criada na Faculdade de Medicina Veterinária - USP

Enriquecimento em meios seletivos líquidos (MRS E BSM), sob condição anaeróbica.

Cultivo utilizando os mesmos meios sólidos. Condição anaeróbica

Seleção aleatória de aproximadamente 314 colônias

Teste de produção de bacteriocina. Cepa desafiada: *Salmonella* Heidelberg 198A

Seleção dos maiores halos de produção = 35 isolados.

Cultivo sob anaerobiose por 24h – ***Sobrenadantes tratados:*** correção do pH para 6.0-6.5. **Sobrenadantes NÃO tratados:** sem correção - ação dos ácidos orgânicos.

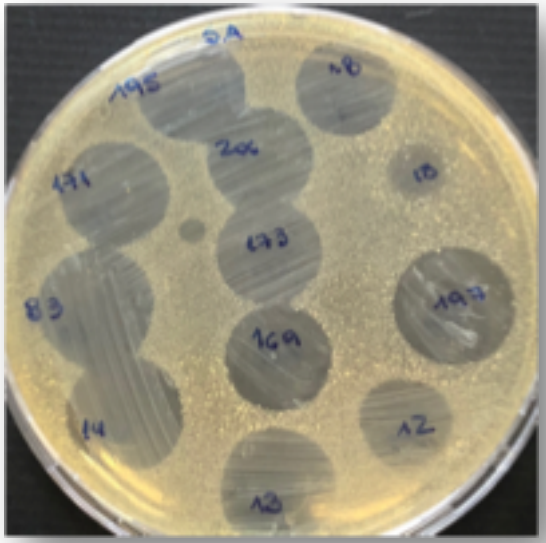
Coloração de Gram e teste de catalase

Bacilos e cocobacilos Gram-positivo + catalase -

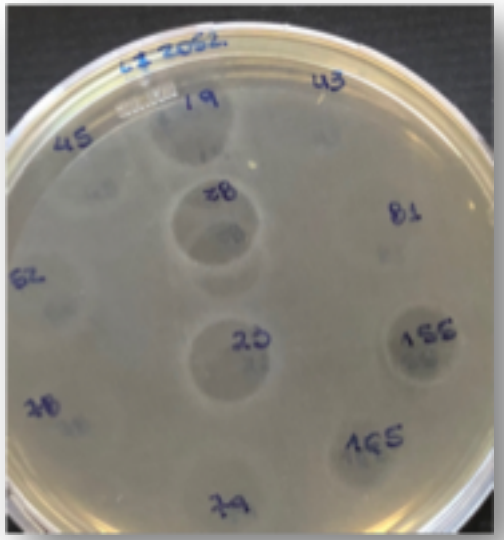
Sobrenadantes tratados

Teste de produção de bacteriocina.
Algumas cepas desafiadas:

- ✧ *Salmonella* Heidelberg
- ✧ *Salmonella* Enterica
- ✧ *Listeria monocytogenes*
- ✧ *Staphylococcus aureus*

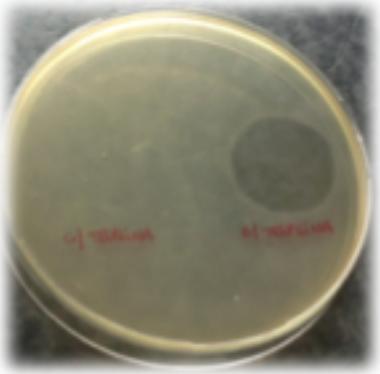


Staphylococcus aureus



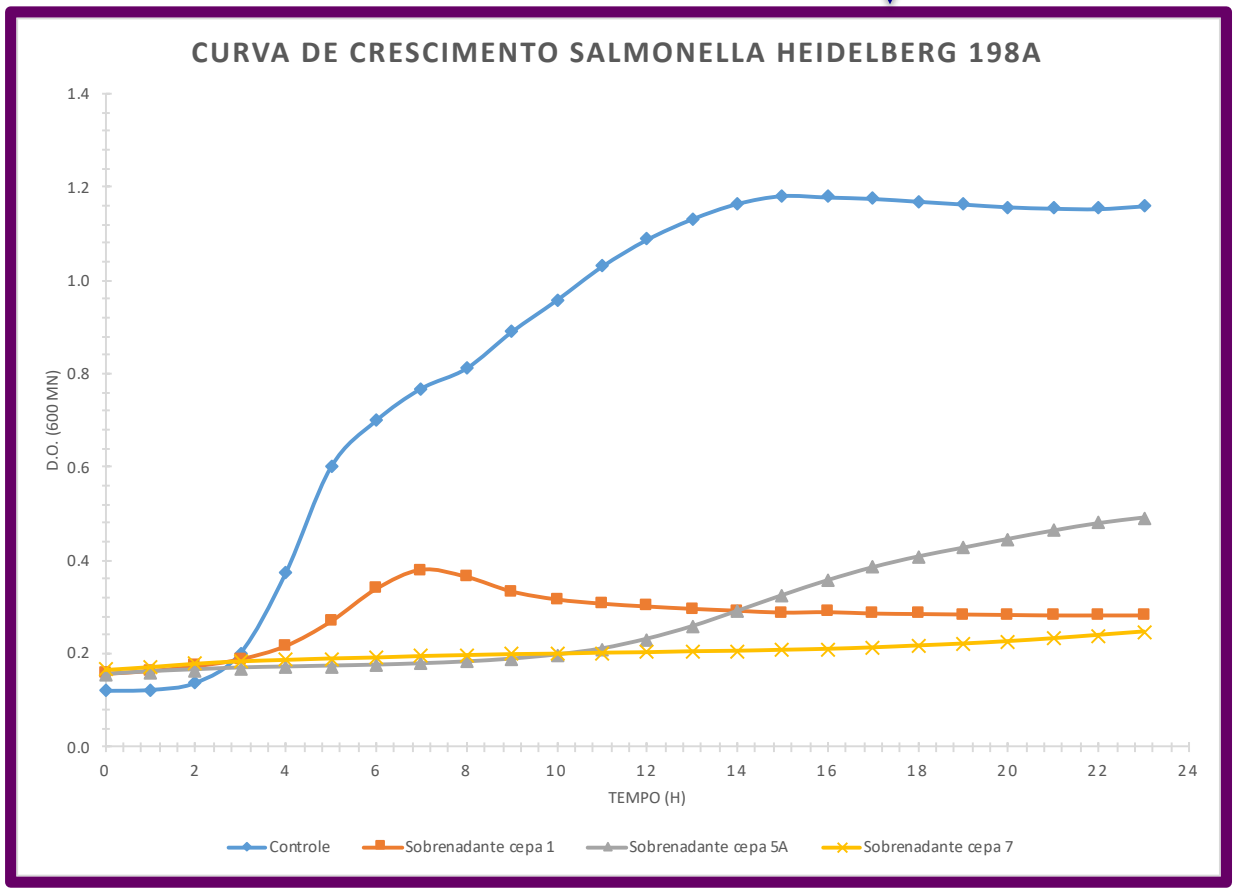
Listeria monocytogenes

Ensaios com enzimas proteolíticas



Sobrenadantes NÃO tratados

Teste de atividade antimicrobiana *dos ácidos orgânicos* contra *Salmonella* Heidelberg



E as vitaminas?

Os isolados que geraram os maiores halos de inibição na etapa anterior, foram selecionado = **8 isolados.**

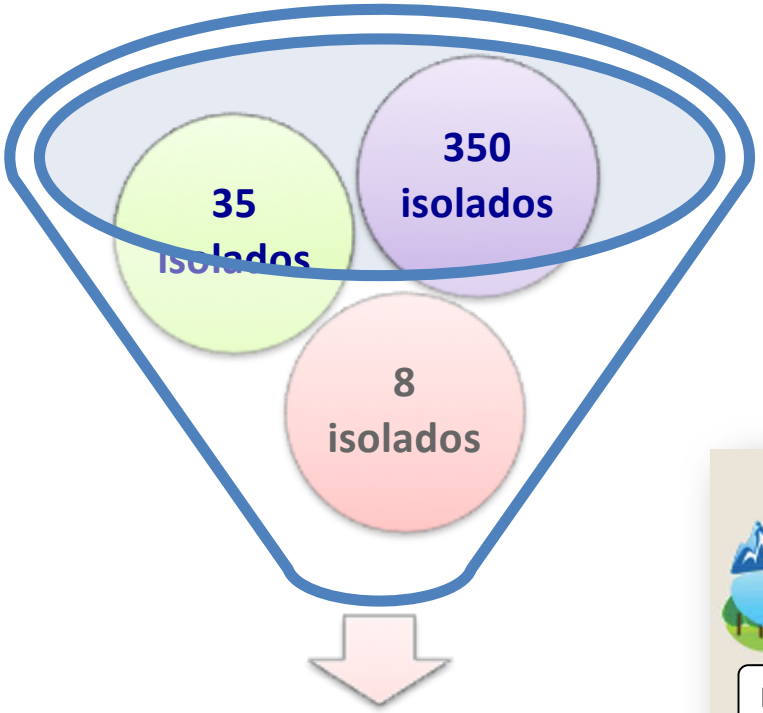
Metodologia para produção **ÁCIDO FÓLICO** e **RIBOFLAVINA**

Isolados	Riboflavina	Ácido fólico
C43	Sim	Sim
C81	Não	Sim
C83	Não	Sim
C171	Sim	Não
C173	Sim	Sim
C195	Sim	Sim
C197	Não	Não
C206	Não	Não

Isolados	Riboflavina	Ácido fólico
C43	Sim	Sim
C81	Não	Sim
C83	Não	Sim
C171	Sim	Não
C173	Sim	Sim
C195	Sim	Sim
C197	Não	Não
C206	Não	Não

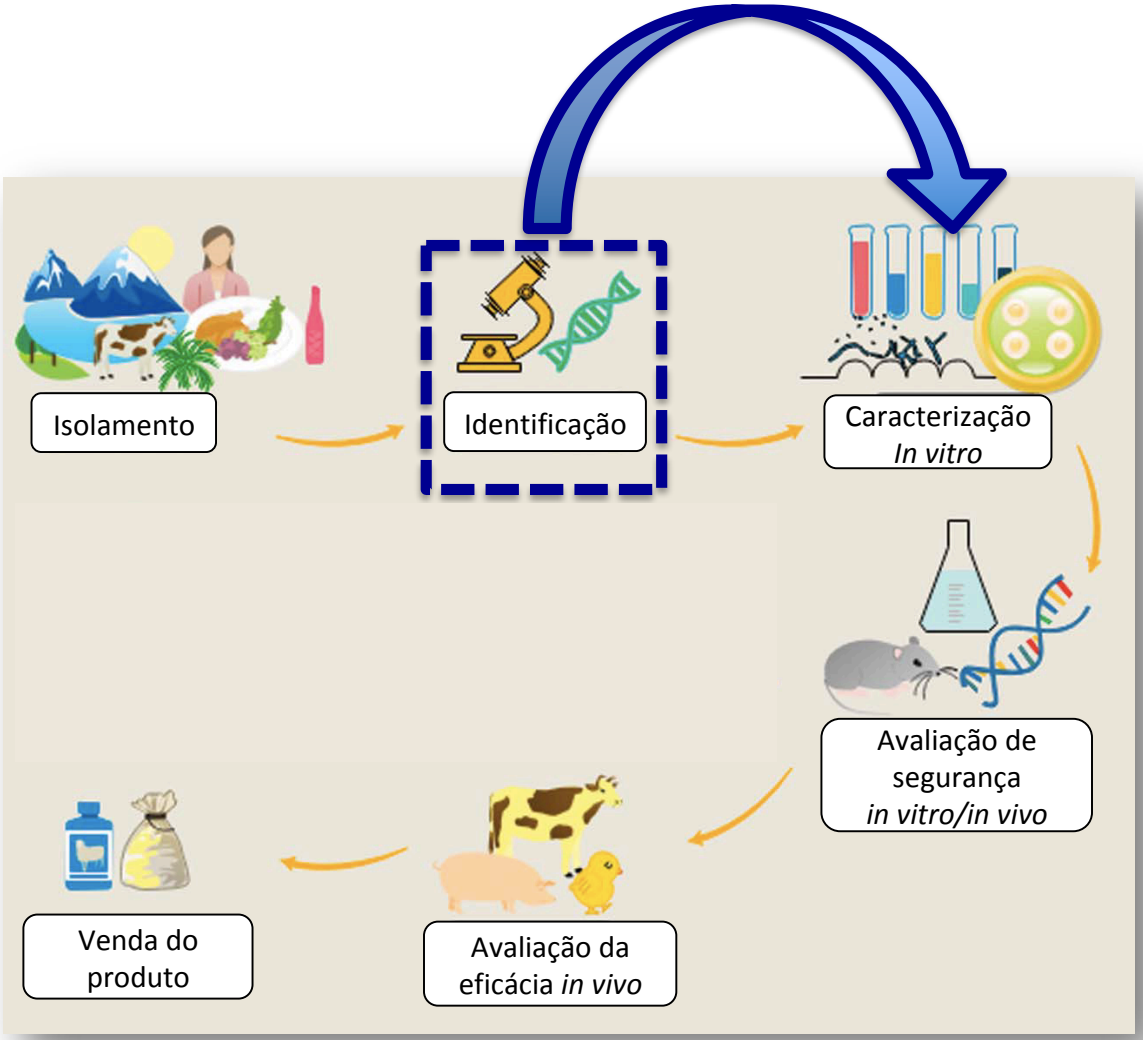
Identificação por métodos moleculares – MALDI-TOF

Lactococcus lactis* subsp. *lactis



Lactococcus lactis* subsp. *lactis

Próximas etapas



OBRIGADO!

Dra. Sabrina da Silva Sabo– FCF/USP
sabrinasabo@gmail.com