Ciência & Tecnologia
Fatec-JB

ISSN: 2178-9436

FOSFATASE ALCALINA DE FRANGOS DE CORTE: UMA ABORDAGEM CINÉTICA E FUNCIONAL NO CONTEXTO DA MINERALIZAÇÃO ÓSSEA

ALKALINE PHOSPHATASE OF BROILER CHICKENS: A KINETIC AND FUNCTIONAL STUDY IN THE CONTEXT OF BONE MINERALIZATION

Luiz Flávio José dos Santos [I]
Adriano Marques Gonçalves [II]
Rafael Rodrigues Colosio [III]
Gabriella Cavazzini Pavarina [IV]
Ligia Maria Neira [V]

RESUMO

Com o objetivo de caracterizar cineticamente a fosfatase alcalina (FA) do tecido ósseo de frangos de corte e discutir seu papel na mineralização, a enzima foi solubilizada a partir de epífises tibiais de aves de 21 dias utilizando fosfolipase C de *Bacillus thuringiensis*. A caracterização bioquímica revelou um pH ótimo de 10,5 para a hidrólise do substrato artificial *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NFF). A análise cinética demonstrou um comportamento michaeliano, com alta afinidade pelo substrato (K_m = 56,49 µM) e elevada eficiência catalítica (V_{max}/K_m = 9,06). O estudo de inibidores revelou que o fosfato inorgânico (Pi) atua como inibidor competitivo, enquanto o levamisol e a teofilina apresentaram inibição incompetitiva. O vanadato destacou-se como o inibidor mais potente, atuando de forma competitiva. Os íons Zn^{2+}, em excesso, exerceram efeito inibitório não competitivo. A enzima demonstrou considerável estabilidade térmica, mantendo atividade a 50°C. Os resultados indicam que a FA óssea de frangos possui propriedades cinéticas altamente conservadas e especializadas, fundamentais para sua função na mineralização do tecido ósseo.

Palavras-chave: fosfomonohidrolase; cinética enzimática; mineralização óssea; frango de corte; saúde esquelética.

ABSTRACT

To kinetically characterize alkaline phosphatase (AP) from broiler bone tissue and discuss its role in mineralization, the enzyme was solubilized from tibial epiphyses of 21-day-old birds using phospholipase C from Bacillus thuringiensis. Biochemical characterization revealed an optimal pH of 10.5 for the hydrolysis of the artificial substrate *p*-nitrophenylphosphate (*p*-NFF). Kinetic analysis demonstrated Michaelian behavior, with high affinity for the substrate (K_m = 56.49 µM) and high catalytic efficiency (V_{max}/K_m = 9.06). Inhibitor analysis revealed that inorganic phosphate (Pi) acts as a competitive inhibitor, while levamisole and theophylline exhibited uncompetitive inhibition. Vanadate emerged as the most potent inhibitor, acting competitively. Excess Zn^{2+} ions exerted a noncompetitive inhibitory effect. The enzyme demonstrated considerable thermal stability, maintaining activity at 50°C. The

[I] Doutor, Centro Paula Souza - Fatec - Ribeirão Preto, luiz.santos02@cpsc.sp.gov.br.
[II] Doutor, Universidade de Araraquara – UNIARA, adrianogoncalves.bio@gmail.com.
[III] Doutor, FCAV - Unesp – Jaboticabal, rafacolozio@gmail.com.
[IV] Mestra, FCAV - Unesp – Jaboticabal, gc.pavarina@unesp.br.
[V] Doutora, Universidade de Araraquara – UNIARA, lmneirar@gmail.com.

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

results indicate that chicken bone FA possesses highly conserved and specialized kinetic properties, essential for its role in bone tissue mineralization.

Keywords: phosphomonohydrolase; enzyme kinetics; bone mineralization; broiler chicken; skeletal health.

Data de submissão do artigo: 11/09/2025.
Data de aprovação do artigo para edição de 2026: 30/04/2026.
Data de publicação do artigo: 01/08/2026
DOI: https://doi.org/10.52138/citec.v18i01.485

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira consolidou-se como um setor de destaque no cenário mundial, sendo o maior exportador de carne de frango desde 2011 e o terceiro maior produtor, atrás apenas de China e Estados Unidos. A produção nacional gira em torno de 15 milhões de toneladas, um marco alcançado mediante significativos avanços tecnológicos nas áreas de melhoramento genético, manejo, sanidade e nutrição (Teixeira *et al.*, 2021). A evolução do setor é ilustrada pela drástica redução no tempo de abate e na eficiência alimentar, a criação passou de 105 dias para o abate e uma taxa de conversão alimentar de 3,5 kg de ração/kg de carne em 1930, para aproximadamente 35 dias e uma taxa de 1,839 em 2009 (ABPA, 2008; Pavarina *et al*., 2025).

Este ganho de produtividade, no entanto, trouxe consigo desafios fisiológicos, o intenso melhoramento genético para o maior rendimento de carne superou a capacidade de desenvolvimento do esqueleto das aves, levando a um aumento na incidência de distúrbios locomotores e comprometimentos do sistema imune, problemas que podem impactar negativamente o desempenho zootécnico e resultar em condenação de carcaças (Pizauro; Ciancaglini; Macari, 2002). Garantir um desenvolvimento esquelético adequado tornou-se, portanto, crucial para a sustentabilidade da produção, nesse contexto, o fósforo (P) emerge como um nutriente fundamental (Santos *et al*., 2023).

O fósforo desempenha um papel central em inúmeros processos biológicos para além de sua função mais conhecida na formação da hidroxiapatita e na mineralização óssea, ele é componente essencial de moléculas vitais como os ácidos nucleicos (DNA e RNA), o trifosfato de adenosina (ATP) e os fosfolipídios que formam a base estrutural das membranas celulares (Serna; Bergwitz, 2020). Adicionalmente, participa na regulação da atividade de diversas enzimas e proteínas transportadoras, posicionando-se como o segundo mineral mais abundante no organismo animal (Gonçalves *et al.*, 2015; Pizauro *et al.*, 1998). A regulação fina desses processos é frequentemente mediada por mecanismos de fosforilação e desfosforilação de proteínas, que controlam eventos celulares críticos como divisão, diferenciação, apoptose, expressão gênica e transporte (Aoyama *et al.*, 2003).

As enzimas responsáveis pela clivagem de grupos fosfato, tal qual as fosfomonohidrolases ou fosfatases, são centrais para este controle, pois catalisam a hidrólise de ésteres de fosfato e estão amplamente distribuídas na natureza. São classificadas principalmente em três grupos: fosfatases ácidas, alcalinas e proteínas fosfatases (Aoyama *et al.*, 2003). As proteínas fosfatases são subdivididas de acordo com o resíduo de amino ácido que desfosforilam (serina/treonina ou tirosina) (Gonçalves *et al.*, 2021), as fosfatases ácidas atuam em pH ótimo por volta de 5,0 e são comumente associadas a lisossomos. no tecido

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

ósseo, a isoforma tartarato-resistente é um marcador característico dos osteoclastos (Colósio *et al*., 2024; Santana *et al*., 2025).

Já as fosfatases alcalinas (FAs), metaloenzimas que exibem atividade ótima em pH alcalino, estão frequentemente ancoradas à membrana plasmática via glicosilfosfatidilinositol (GPI), embora isoformas solúveis também tenham sido descritas (Santos; Pizauro, 2025). Em humanos, existem pelo menos quatro isoenzimas tecido-específicas (intestinal, placentária, de células germinativas e a isoforma não-específica de fígado/osso/rim). Estruturalmente, as FAs são homodímeros, onde cada subunidade monomérica requer a presença de dois íons Zn^{2+} e um íon Mg^{2+} para sua atividade catalítica máxima. Estes íons metálicos são indispensáveis não apenas para a manutenção da estrutura terciária e quaternária da enzima, mas também para a correta formação e estabilização do estado de transição durante a catálise (Millán, 2006).

O centro ativo da fosfatase alcalina é um arranjo complexo que coordena os íons metálicos e os resíduos de aminoácidos específicos, criando um microambiente ideal para a ligação do substrato e a facilitação da reação de hidrólise através de interações iônicas e ligações de hidrogênio (Coleman, 1992). Sendo que a atividade enzimática é sensível a uma série de fatores cinéticos, incluindo a concentração de substrato e da própria enzima, pH, temperatura, composição iônica do meio e a presença de inibidores ou ativadores (Nelson; Cox, 2014). Onde o estudo de inibidores, como o fosfato inorgânico (Pi) é uma ferramenta enzimológica valiosa para elucidar o mecanismo catalítico, investigar a regulação da atividade e caracterizar isoformas diferentes (Pizauro *et al.*, 1988).

Na ossificação endocondral, a fosfatase alcalina é uma enzima crucial, secretada pelos osteoblastos, com função principal de hidrolisar o pirofosfato inorgânico (PPi), um potente inibidor da calcificação, neutralizando sua ação. Simultaneamente, essa reação libera fosfato inorgânico (Pi), aumentando sua concentração local o que é essencial para ossificação. Essa dupla ação cria o ambiente químico ideal para a precipitação de cristais de hidroxiapatita de cálcio. Portanto, a FA é essencial para iniciar e promover a mineralização da matriz óssea (Pizauro; Ciancaglini; Macari, 2002; Santos; Pizauro, 2025).

Em um cenário da intensa produção de frangos de corte, o estudo da fosfatase alcalina de tecido ósseo é um passo fundamental para desenvolver estratégias nutricionais que possam melhorar a disponibilidade de P e a saúde óssea dos animais, mitigando os problemas associados ao rápido crescimento. Desta forma, este estudo teve como objetivo caracterizar cineticamente a fosfatase alcalina purificada a partir de epífises de tíbias de frangos de corte.

2 METODOLOGIA DA PESQUISA

Essa seção apresenta os procedimentos metodológicos dessa pesquisa.

2.1 Obtenção dos animais e desenho experimental

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV (Protocolo nº 021238/13), foram utilizados frangos de corte machos da linhagem Cobb-500 com 21 dias de idade e criados em condições termoneutras com luz contínua.

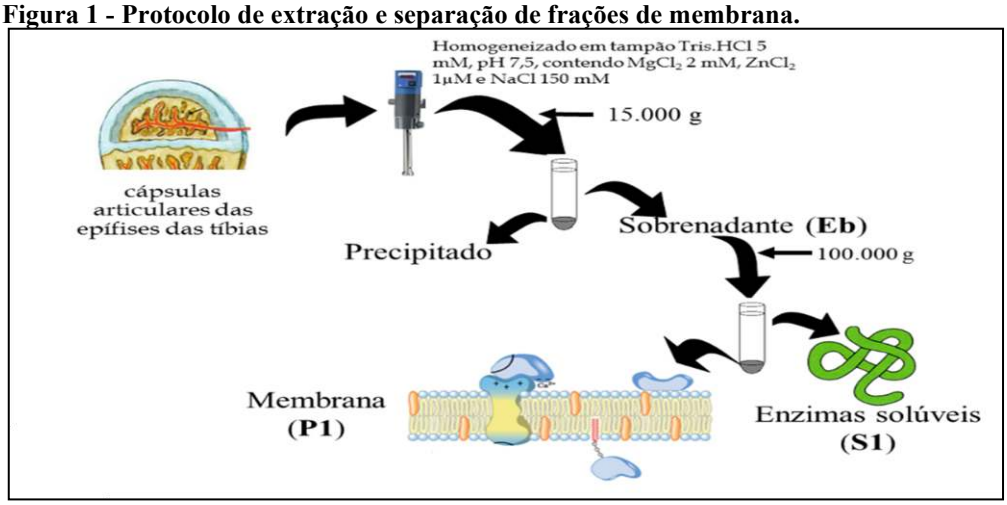
2.2 Coleta de tecido e preparação do extrato enzimático

Após sacrifício por deslocamento cervical as tíbias foram coletadas, limpas e congeladas em nitrogênio líquido. As epífises tibiais foram homogeneizadas em tampão Tris-

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

HCl 5 mM (pH 7,5) com $MgCl_2$ 2 mM e NaCl 150 mM, o homogeneizado foi centrifugado a 15.000xg por 10 min a 4°C. O sobrenadante (Extrato Bruto - EB) foi submetido à ultracentrifugação a 100.000xg por 2h a 4°C, então o precipitado (P1), fração de membrana rica em fosfatase alcalina, foi solubilizado para posteriores tratamentos (Figura 1).

Figura 1 - Protocolo de extração e separação de frações de membrana.

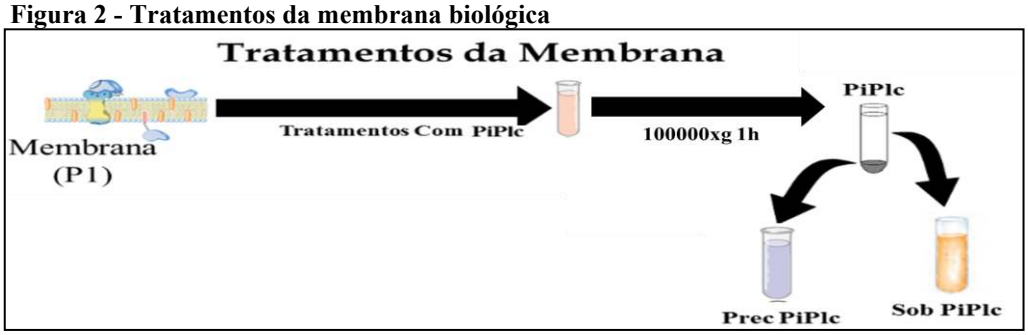


Fonte: autoria própria (2025)

2.3 Tratamento com fosfolipase C (PiPLC) de *Bacilus thuringiensis*

A fração de membrana (P1) foi incubada com PiPLC de *B. thuringiensis* a 37°C por 1h para liberar formas ancoradas da enzima, logo após, ocorreu centrifugação a 100.000xg por 2h a 4°C, o sobrenadante (Sob PiPLC) foi congelado em nitrogênio líquido e preservado em freezer a -80ºC (Figura 2).

Figura 2 - Tratamentos da membrana biológica



Fonte: autoria própria (2025)

2.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade *p*-nitrofenilfosfatásica (*p*-NFFásica) foi determinada por medida da liberação de *p*-nitrofenol a 410 nm (ε = 17.600 M^{-1} cm^{-1}), adaptado de Pizauro *et al.* (1988). A mistura de reação continha tampão AMPOL 100 mM (pH 9,4), $MgCl_2$ 2 mM, $ZnCl_2$ 1 µM e *p*-NFF 1 mM. Uma unidade de atividade ($U.mg^{-1}$) libera 1 nmol de *p*-nitrofenol por minuto miligrama de proteína.

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

2.5 Caracterização bioquímica enzimológica

- Efeito do pH: A atividade determinada em tampões acetato de sódio (pH 3,5–6,5), Tris-HCl (pH 6,5–8,5) e AMPOL (pH 8,5–11,0).
- Cinética de substrato: Foi determinada com concentrações de *p*-NPP de 0,001 a 8 mM.
- Inibição enzimática: Testada com inibidores diversos de acordo com a tabela 1.
- Estabilidade térmica: Enzima incubada a 40–60°C por diferentes períodos com medida de atividade residual.

Tabela 1 - Compostos e concentrações utilizados nos testes de inibição

Inibidor	Concentração
Fosfato	0, 1, 2 e 4 mM
Levamisol	0, 0,001 e 0,01 mM
Teofilina	0, 0,06, 0,1 e 0,16 mM
Vanadato	0, 0,01 e 0,02 mM
Zinco	0, 0,004, 0,006 e 0,008 mM

Fonte: autoria própria (2025)

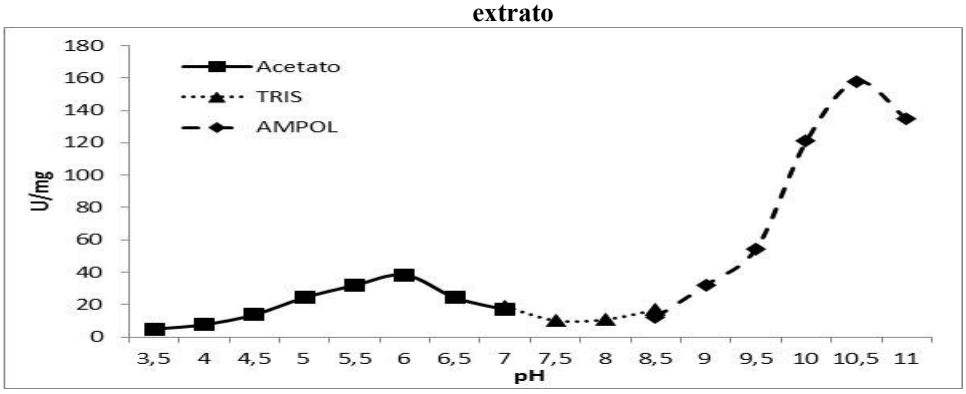
2.6 Análises quantitativas e estatísticas

A proteína foi quantificada pelo método de Hartree (1972). Os parâmetros cinéticos foram determinados por ajuste à equação de Hill (Origin Pro 8). As análises estatísticas foram realizadas no SAS System (v. 9.0) com ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$), em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A liberação eficiente da enzima pela PiPLC de sua ancoragem à membrana via GPI, foi previamente descrito Santos e Pizauro (2025). Neste trabalho a caracterização cinética da FA solubilizada de epífises tibiais de frangos de corte revelou propriedades enzimáticas fundamentais para a compreensão de seu papel na mineralização óssea, o pH ótimo aparente para a atividade *p*-nitrofenilfosfatásica (*p*-NFFásica) da forma solubilizada foi de 10,5 (Figura 3), consistente com a natureza alcalina da enzima e semelhante ao reportado para FAs de outros tecidos ósseos (Curti *et al.*, 1987; Say *et al.*, 1991).

Figura 3 - Efeito do pH sobre a atividade das fosfatases presente no sobrenadante da ultracentrifugação, expressas em nmol de produto liberado por minuto de reação por miligrama de proteína presente no extrato



Fonte: autoria própria (2025)

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

A análise cinética da hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato mostrou um comportamento Michaeliano, com uma velocidade máxima (V_{max}) de 507,46 $U.mg^{-1}$ e uma constante de Michaelis (K_m) de 56,49 µM (Tabela 2), refletindo uma alta afinidade e eficiência catalítica (V_{max}/K_m = 9,06) pelo substrato artificial. Estes valores são comparáveis aos obtidos para FAs associadas a vesículas de matriz envolvidas em processos de calcificação ectópica (Ciancaglini *et al.*, 2006), de osso alveolar (Simão *et al.*, 2007) e de cartilagem epifisária (Hsu *et al.*, 1985) de mamíferos, indicando uma conservação funcional entre essas isoformas.

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos de hidrólise do *p*-NFF pela fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de epífise de aves normais

V ($U.mg^{-1}$)	n	K_m (µM)	V/K_m
507,46	1,3	56,49	9,06

Fonte: autoria própria (2025)

Ainda assim, a alta afinidade pelo substrato artificial *p*-NFF, similar ao demonstrado em outros estudos com *Lithobates catesbeianus* (COLOSIO *et al.*, 2024), reforça o papel crucial da enzima em gerar fosfato inorgânico para a formação da hidroxiapatita.

O estudo dos mecanismos de inibição forneceu resultados consistentes sobre a regulação e o mecanismo catalítico da enzima, o fosfato inorgânico (Pi), um produto da reação, atuou como inibidor competitivo (Figura 4), um fenômeno amplamente documentado para FAs de diversas fontes (Pizauro *et al.*, 1987).

Este padrão sugere que o Pi compete diretamente com o *p*-NFF pelo sítio ativo da enzima. A mudança no tipo de inibição relatada em alguns estudos para a enzima ancorada a membrana (Curti *et al.*, 1987) sugere que o microambiente membranar pode modular as propriedades cinéticas da FA.

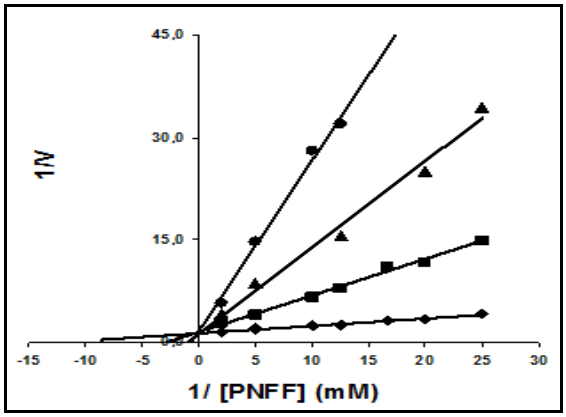
O levamisol, um inibidor clássico de FA não tissular, exibiu um padrão de inibição incompetitiva (Figura 5), concordando com observações prévias para a enzima associada à membrana (Curti *et al.*, 1987) e de condrócitos (Fortuna *et al.*, 1979). Este padrão sugere a formação de um complexo ternário enzima-substrato-inibidor (ESI), indicando que o levamisol se liga preferencialmente ao complexo enzima-fosfato (intermediário covalente).

De modo similar, a teofilina, um análogo de nucleotídeos, também atuou como um inibidor incompetitivo (Figura 6), corroborando dados para FA de esqueleto humano (Farley; Ivey; Baylink, 1980) e de placas ósseas (Curti *et al.*, 1987).

Farley e colaboradores (1980) propuseram que a teofilina se liga a um sítio alostérico que é exposto apenas após a formação do intermediário fosforilado. O vanadato destacou-se como o inibidor mais potente, atuando de forma competitiva (Figura 7), um resultado consistente com estudos anteriores (Curti *et al.*, 1987), a alta eficiência inibitória do vanadato é típica de enzimas que formam intermediários covalentes de fosfoenzima estável durante a catálise (Seargeant; Stinson, 1979).

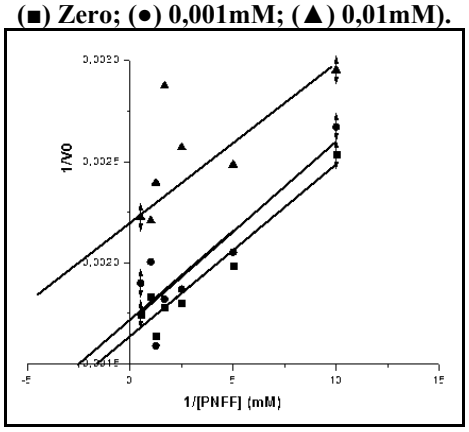
Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

Figura 4 - Inibição da atividade PNFFásica da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de aves normais pelo fosfato (Concentrações: (♦) Zero; (■) 1mM; (▲) 2mM; (●) 4mM).



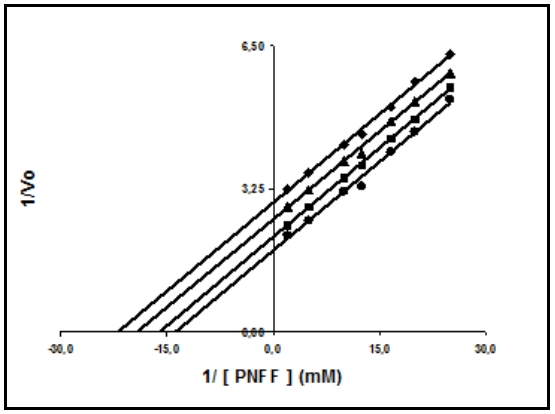
Fonte: autoria própria (2025)

Figura 5 - Inibição da atividade PNFFásica da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de aves normais pelo levamisol (Concentrações: (■) Zero; (●) 0,001mM; (▲) 0,01mM).



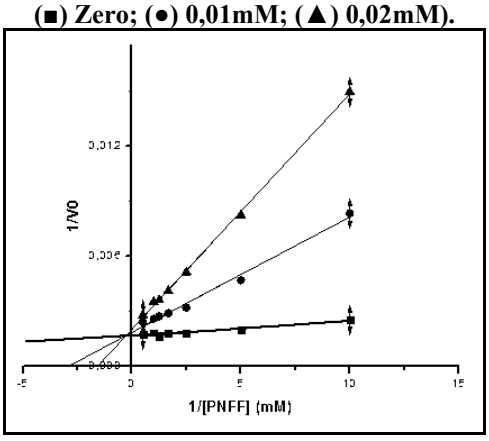
Fonte: autoria própria (2025)

Figura 6 - Inibição da atividade PNFFásica da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de aves normais pela teofilina (Concentrações: (●) Zero; (■) 0,06mM; (▲) 0,1mM; (♦) 0,16mM).



Fonte: autoria própria (2025)

Figura 7 - Inibição da atividade PNFFásica da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de aves normais pelo vanadato (Concentrações: (■) Zero; (●) 0,01mM; (▲) 0,02mM).



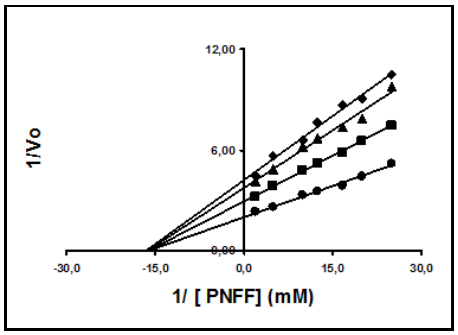
Fonte: autoria própria (2025)

Ao encontro do descrito na literatura, os íons Zn^{2+}, embora componentes essenciais do sítio catalítico, podem exercer efeito de inibidor não competitivo, quando em excesso (Figura 8) (Ciancaglini; Pizauro; Leone, 1992), este efeito é frequentemente atribuído ao deslocamento do íon Mg^{2+} de seu sítio de ligação essencial.

O perfil de estabilidade térmica da enzima (Figura 9) se mostrou estável, mantendo atividade praticamente inalterada a 50°C e uma meia-vida ($T_{0,5}$) de aproximadamente 30 minutos a 55°C, esta considerável estabilidade térmica é uma característica comum de muitas metaloenzimas e reflete a robustez da estrutura quaternária do homodímero, estabilizada por suas ligações de zinco e magnésio (Vallee; Auld, 1990).

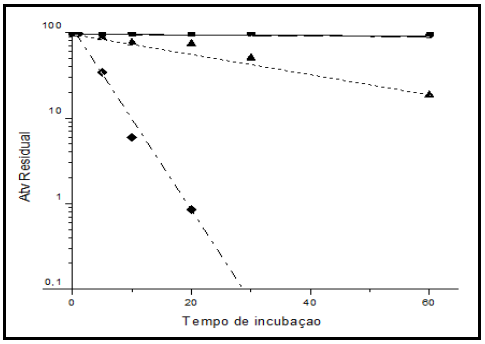
Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

Figura 8 - Inibição da atividade PNFFásica da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de aves normais pelo cloreto de zinco (Concentrações: (●) Zero; (■) 0,004mM; (▲)



Fonte: autoria própria (2025)

Figura 9 - Efeito da inativação térmica na atividade de hidrólise do PNFF pela fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de animais normais.



Fonte: autoria própria (2025)

Os resultados suportam a ideia que a fosfatase alcalina é um importante agente na promoção da mineralização ao hidrolisar potentes inibidores da cristalização, como o PPi, e ao fornecer Pi para a formação da hidroxiapatita (Millán, 2013). A correlação direta entre a atividade da FA óssea e a taxa de mineralização esquelética demonstrada em aves (Tilgar *et al.*, 2008), aliada aos dados cinéticos aqui apresentados, consolida a utilização desta enzima como um biomarcador confiável e sensível da osteogênese e da saúde óssea em frangos de corte. Futuros estudos focados na expressão gênica e na regulação desta enzima durante desafios metabólicos podem fornecer informações valiosas para estratégias nutricionais e de manejo visando a saúde esquelética na avicultura industrial.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fosfatase alcalina solubilizada de epífises tibiais de frangos de corte exibe propriedades cinéticas e catalíticas típicas de uma fosfomonohidrolase altamente especializada e conservada evolutivamente e imprescindível no processo de mineralização óssea em frangos de corte, podendo ser utilizada como marcador da ossificação em aves de corte.

REFERÊNCIAS

AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatase: propriedades e funções biológicas. **Quim. Nova**, v. 26, n. 6, p. 896-900. 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL - ABPA. **História da avicultura no Brasil**. Disponível em: http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil. Acesso em: 02 fev. 2014.

BRUNEL, C.; CATHALA, G. Activation and inhibition processes of alkaline phosphatase from bovine brain by metal ions (Mg^{2+} and Zn^{2+}). **Biochim. Biophys. Acta**, v. 309, p. 104-115, 1973.

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

CATHALA, G.; BRUNEL, C.; CHAPPELET-TORDO, D.; LAZDUNSKI, M. Bovine kidney alkaline phosphatase: catalytic properties, subunit interactions in the catalytic process, and mechanism of Mg^{2+} stimulation. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 6046-6053. 1975b.

CIANCAGLINI, P.; SIMÃO, A. M. S.; CAMOLEZI, F. L.; MILLAN, J. L.; PIZAURO, J. M. Contribution of matrix vesicles and alkaline phosphatase to ectopic bone formation. **Braz. J. Med. Bio. Res.**, v. 39, p. 603-610, 2006.

COLEMAN, J. E. **Structure and Mechanism of Alkaline Phosphatase**. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, v. 21, n. 1, p. 441-483, June 1992. Disponível em: https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bb.21.060192.002301. Acesso em: 3 set. 2025

COLOSIO, R. R. *et al.* Enzymatic activity of bone markers on *Lithobates catesbeianus* growth during the ossification process. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, e251970, 2024.

CURTI, C. *et al.* Kinetic characteristics of some inhibitors of matrix-induced alkaline phosphatase. **Cellular and Molecular Biology**, v. 33, n. 5, p. 625-635, 1987.

CURTI, C.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Kinetic characteristics of some inhibitors of matrix-induced alkaline phosphatase. **Cell. Molec. Biol.**, v. 33, p. 625-635, 1987.

CYBORON, G. W.; WUTHIER, R. E. Purification and initial characterization of intrinsic membrane bound alkaline phosphatase from chicken epiphyseal cartilage. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 7262-7268, 1981.

FARLEY, J. R.; IVEY, J. L.; BAYLINK, D. J. Human skeletal alkaline phosphatase: kinetic studies including pH dependence and inhibition by theophylline. **J. Biol. Chem.**, v. 255, p. 4680-4686, 1980.

FORTUNA, R.; ANDERSON, H. C.; CAARTY, R.; SAJDERA, S. W. Enzymatic characterization of the chondrocytic alkaline phosphatase isolated from bovine fetal epiphyseal cartilage. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 570, p. 291-302, 1979.

GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; SANTANA, C. C.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. Tail phosphatases activity: a study during growth and metamorphosis of *Lithobates catesbeianus*. **Copeia**, n. 2, 2015.

GONÇALVES, Adriano Marques; SANTANA, Caroline Carla; SANTOS, Luiz Flávio José dos; COLOSIO, Rafael Rodrigues; BALBUENA, Tiago Santana; e PIZAUREO, João Martins. Identification and characterization of acid and alkaline phosphatases and protein phosphatases in *L. catesbeianus* tail during metamorphosis. **Biologia**, v. 76, p. 3521-3531, 2021. DOI: 10.1007/s11756-021-00877-9.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

HSU, H. H. T.; MUNOZ, P. A.; BARR, J.; OPPLIGER, I.; MORRIS, D. C.; VAANANEM, H. K.; TARKENTON, N.; ANDERSON, H. C. Purification and partial characterization of alkaline phosphatase of matrix vesicles from fetal bovine epiphyseal cartilage. Purification by monoclonal antibody affinity cromatography. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 1826-1831, 1985.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Abate de animais, produção de leite, couro e ovos**. 2013. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201304_1.shtm. Acesso em: 28 mar. 2014.

LEONE, F. A.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Effect of pH on the modulation of rat osseous plate alkaline phosphatase by metal ions. **Int. J. Biochem**., v. 24, p. 923-928, 1992.

MILLAN, J. L. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. **Calcif. Tissue Int.**, v. 93, p. 299-306, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2011. 1304 p.

PAVARINA, GABRIELLA CAVAZZINI; FERNANDEZ ALARCON, MIGUEL FREDERICO; SANTANA, CAROLINE CARLA; SANTOS, LUIZ FLÁVIO JOSÉ DOS; FURLAN, RENATO LUIS; PIZAURUO JUNIOR, JOAO MARTINS. Avaliação da fosfatase alcalina intestinal de frangos de corte alimentados com probióticos e/ou óleos essenciais. *In:* **FRONTEIRAS** da tecnologia: explorando o futuro da ciência e da inovação. Ponta Grossa: Atena Edição de Livros, [s.d.]. cap.2. 2025. DOI: 10.22533/at.ed.782122512082.

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Characterization of the phosphatidylinositol specific phospholipase C-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 152, n. 2, p. 121-129, 1995.

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismo de lesão e controle. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, v. 3, n. 5, p. 169-185, 2002.

PIZAURO, J. M.; CURTI, C.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Triton X-100 solubilized bone matrix-induced alkaline phosphatase. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 87, p. 921-926, 1987.

PIZAURO, J. M.; CURTI, C.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Kinetic properties of Triton X-100 solubilized bone matrix-induced alkaline phosphatase. **Cell. Mol. Biol.**, v. 34, n. 5, p. 553-562, 1988.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2011. 252 p.

Ciência & Tecnologia
Fatec-JB
ISSN: 2178-9436

SAY, J. C.; FURRIEL, R. P. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Alkaline phosphatase from ret osseus plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1074, p. 256-262, 1991.

SANTANA, Caroline Carla; PAVARINA, Gabriella Cavazzini; COLOSIO, Rafael Rodrigues; NEIRA, Ligia Maria; GONÇALVES, Adriano Marques; SANTOS, Luiz Flávio José dos; PIZAURTO JUNIOR, Joao Martins. *Estudo de padronização das atividades de fosfatases e LPS-desfosforilase presentes em fígado de girinos de rã-touro (Lithobates catesbeianus)*. **Anais**, 2025. DOI: 10.46898/autopub.87c60bf2-e993-4e41-b475-814c3f6975a3. Publicado em 6 de setembro de 2025, às 20:16:51.

SANTOS, L. F. J. et al. Effects of Supplementation of Zinc, Manganese, or Copper on Growth Performance, Bone Mineralization and Antioxidant Status of Broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 25, 2023. DOI: 10.1590/1806-9061-2022-1722.

SANTOS, L. F. J. dos; PIZAURO JUNIOR, J. M. Estudo da interação da fosfatase alcalina com a membrana plasmática obtida de tecido ósseo de frangos de corte. In: **Anais**. [S. l.], 1 set. 2025. Disponível em: https://www.autopubeditora.com/trabalho-2025/2bfcc279-42cc-424b-9a28-98f898a3499c. Acesso em: 4 set. 2025.

SEARGEANT, L. E.; STINSON, R. A. Inhibition of human alkaline phosphatase by vanadate. **Biochem. J.**, v. 181, p. 247-250, 1979.

SERNA, J.; BERGWITZ, C. Importance of Dietary Phosphorus for Bone Metabolism and Healthy Aging. **Nutrients,** v. 12, 2020.

SIMÃO, A. M.; BELOTI, M. M.; CEZARINO, R. M.; ROSA, A. L.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. **Comp. Biochem. Physiol. A**: Mol. Integr. Physiol., v. 146, n. 4, p. 679-687, 2007.

TEIXEIRA, V. G. *et al.* O crescimento da avicultura de corte no Brasil e no mundo. **Revista Acadêmica Ciência Agrária Ambiental**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 11-20, 2021. Disponível em: https://periodicos.pucpr.br/cienciaagrariaambiental/article/view/25697. Acesso em: 4 set. 2025.

TILGAR, V. et al. The rate of bone mineralization in birds is directly related to alkaline phosphatase activity. **Physiological and Biochemical Zoology,** v. 81, n. 1, p. 106-111, 2008.

VALLEE, B. L.; AULD, D. S. *Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins*. **Biochemistry,** v. 29, n. 24, p. 5647–5659, 19 jun. 1990. DOI: 10.1021/bi00476a001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2200508/. Acesso em: 4 set. 2025