EDIÇÃO 2025 – RESUMO EXPANDIDO

EFEITO DA IDADE DE FRANGOS DE CORTE SOBRE A ATIVIDADE DE *p*-NFFase E DE LPS-DEFOSFORILASE DA FOSFATASE ALCALINA INTESTINAL

EFFECT OF AGE OF BROILERS ON THE ACTIVITY OF p-NFFase AND LPS-DEPHOSPHORYLASE OF INTESTINAL ALKALINE PHOSPHATASE

Luiz Flávio José dos Santos [I]
Gabriella Cavazzini Pavarina [II]
Miguel Frederico Fernandez Alarcon [III]
Renato Luis Furlan [IV]
Joao Martins Pizauro Junior [V]

RESUMO

A fosfatase alcalina intestinal (FAI), enzima intestinal crucial, foi estudada em frangos Cobb-500. Sua atividade (para substratos p-NPP e LPS) foi máxima aos 7 dias, diminuindo aos 21 e 42 dias. Este pico inicial está ligado à imaturidade funcional do trato gastrointestinal e à intensa demanda por digestão e defesa imunológica no estabelecimento da microbiota. A redução posterior indica adaptação fisiológica. A FAI é um biomarcador vital para a saúde intestinal, sendo alvo promissor para estratégias nutricionais na avicultura.

Palavras-chave: fosfomonohidrolase; probióticos; óleos essenciais; avicultura; nutrição animal.

ABSTRACT

FAI, a crucial intestinal enzyme, was studied in Cobb-500 chickens. Its activity (for p-NPP and LPS substrates) peaked at 7 days, decreasing at 21 and 42 days. This initial peak is linked to the functional immaturity of the gastrointestinal tract and the intense demand for digestion and immune defense in establishing the microbiota. The subsequent reduction indicates physiological adaptation. FAI is a vital biomarker for intestinal health and is a promising target for nutritional strategies in poultry farming.

Keywords: phosphomonohydrolase; probiotics; essential oils; poultry farming; animal nutrition.

Data de submissão: 29/08/2025.
Data de aprovação: 17/10/2025.
DOI: 10.52138/sitec.v5i1.455

[I] Doutor, Fatec – Ribeirão Preto, luiz.santos167@fatec.sp.gov.br
[II] Mestre, Secretaria Estadual De Educação, g.cavazzini12@gmail.com
[III] Doutor, Pathovet Labs, miguelffa@hotmail.com
[IV] Doutor, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp – Jaboticabal, rlfurlan@unesp.br
[V] Doutor, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp – Jaboticabal, j.pizauro@unesp.br

EDIÇÃO 2025 – RESUMO EXPANDIDO

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira destaca-se como um setor tecnologicamente avançado, fruto de décadas de progresso em genética, nutrição, manejo e sanidade (Tinôco, 2001). Como segundo maior produtor e maior exportador global de carne de frango, o Brasil viu sua produção atingir a ordem de 15 milhões de toneladas em 2024. Neste contexto, a ração representa até 70% do custo total, o que impulsiona a constante busca por aditivos que melhorem a eficiência alimentar e o crescimento dos animais.

Historicamente, os antibióticos promotores de crescimento (AGP) foram amplamente utilizados, mostrando-se eficazes ao inibir infecções subclínicas, reduzir a competição por nutrientes e aumentar a absorção intestinal. No entanto, seu uso indiscriminado desde a década de 1950 resultou no desenvolvimento de resistência bacteriana em patógenos como *Salmonella* e *Campylobacter coli*, levando à sua restrição. Essa proibição intensificou a pesquisa por alternativas, como probióticos, que atuam por exclusão competitiva, e óleos essenciais com atividade antimicrobiana seletiva (Toledo *et al.,* 2007).

O foco central dessas estratégias é a manutenção da homeostase do trato gastrointestinal (TGI), um ecossistema dinâmico e complexo (Abbott, 2004). Na ave, o TGI é colonizado desde o nascimento por uma microbiota diversa que estabelece uma relação de mutualismo, auxiliando na fermentação, produção de nutrientes e, crucialmente, na proteção contra patógenos transitórios (Abbott, 2004). Fatores como estresse, antibióticos ou dieta inadequada podem romper esse equilíbrio, permitindo a colonização por patógenos e causando desordens.

Além de aditivos dietéticos, o próprio hospedeiro possui mecanismos de defesa, sendo a fosfatase alcalina intestinal (FAI) uma enzima chave nesse processo. Trata-se de uma ectoenzima expressa na superfície apical das microvilosidades dos enterócitos, considerada um marcador da diferenciação celular das vilosidades. A FAI possui múltiplas funções, incluindo participação no transporte de lipídios, regulação do pH duodenal e, de forma mais relevante, na detoxificação do lipopolissacarídeo (LPS) (Alpers; Zhang; Ahnen, 1995).

A função de maior destaque da FAI é sua capacidade de defosforilar o LPS, uma molécula altamente tóxica e presente em bactérias Gram-negativas que causam efeitos deletérios em concentrações mínimas. Ao remover grupos fosfato, a FAI converte o LPS em uma forma inativa, reduzindo drasticamente sua virulência e, consequentemente, prevenindo processos inflamatórios e sepse, contribuindo decisivamente para a homeostase intestinal (Narisawa *et al.,* 2007).

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo quantificar as atividades de *p*-NFFase e de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal de frangos Cobb-500 em diferentes idades

3 METODOLOGIA DA PESQUISA

Esta seção apresenta os procedimentos metodológicos da pesquisa.

3.1 Material biológico

O presente estudo utilizou frangos de corte machos da linhagem Cobb-500, criados em condições controladas de temperatura (termoneutra) e iluminação contínua. A dieta foi formulada à base de milho e farelo de soja, conforme as exigências nutricionais estabelecidas por Rostagno *et al*. (2011). Todos os protocolos envolvendo os animais foram previamente aprovados pela comissão de ética da instituição, estando em conformidade com os princípios éticos para experimentação animal.

3.2 Obtenção do extrato enzimático

Aos 42 dias de idade das aves, seis aves foram abatidas após 12 horas jejum para coleta de amostras. Um segmento de 20 cm do jejuno foi isolado, aberto e a mucosa foi lavada, raspada e criopreservada em nitrogênio líquido e freezer a -70°C. As amostras homogeneizadas seguiram o esquema de centrifugação diferencial modificado de Rueda e Colaboradores (2007).

3.3 Determinação da atividade *p*NPPásica da fosfatase alcalina intestinal

O estudo determinou a atividade da enzima fosfatase alcalina intestinal (FAI) por meio da hidrólise do substrato pNFF, que forma o produto *p*-nitrofenolato (ε= 17600 $M^{-1}cm^{-1}$, pH 13), medido por absorbância a 410 nm. A reação enzimática foi iniciada pela adição da enzima ao meio de reação e interrompida por meio da adição de 1 mL de NaOH 1 M. As determinações foram efetuadas em triplicatas, uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um µmol de *p*-nitrofenolato por minuto por miligrama de proteína presente no extrato, nas condições de ensaio.

3.4 Determinação da atividade LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal

A atividade da LPS-defosforilase foi determinada a 37°C pela quantificação do fosfato inorgânico liberado da hidrólise de LPS (1,5 mg/mL) em solução tampão AMPOL 105 mM (pH 9), contendo $MgCl_2$ 1 mM e $ZnCl_2$ 10 µM. A reação foi iniciada pela adição da enzima e interrompida com TCA 50%, seguida de centrifugação. O fosfato liberado foi quantificado pelo método de Pizauro et al. (1995), através da formação de fosfomolibdato extraído com acetona e medido a 355 nm. A atividade enzimática foi expressa em nmol de fosfato liberado por minuto por mg de proteína, com determinações em triplicata.

3.5 Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método proposto por Bradford (1976) utilizando um kit comercial da Bio-Rad®, utilizando o soroalbumina bovina fração V como padrão proteico.

EDIÇÃO 2025 – RESUMO EXPANDIDO

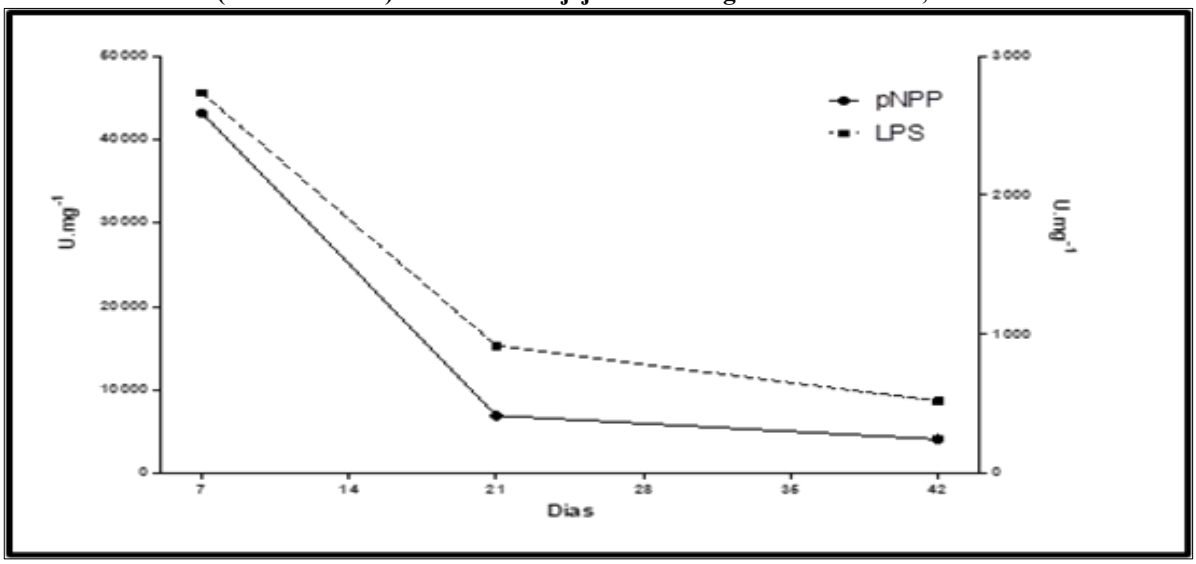
3.6 Análise dos resultados

Os dados foram analisados no software SAS System 9.0, considerando três repetições. Foram aplicados testes de homocedasticidade e normalidade, seguidos de análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da atividade enzimática ao longo do tempo (7, 21 e 42 dias) nos animais revelou que a atividade tanto para o substrato *p*-NPP quanto para o LPS, foi significativamente maior aos 7 dias de idade, diminuindo nos períodos subsequentes (Figura 1). Este perfil temporal está diretamente relacionado à maturação do trato gastrointestinal das aves, que ao eclodirem apresentam um sistema digestório anatomicamente completo, mas funcionalmente imaturo (Macari; Furlan; Gonzales, 2002).

Figura 1 - Atividade específica da fosfatase alcalina intestinal para os substratos *p*-NPP (Eixo Y esquerda) e LPS (Eixo Y direita) na mucosa de jejuno de frangos de corte aos 7, 21 e 42 dias



Fonte: autoria própria (2025)

Nos primeiros dias de vida ocorre um aumento expressivo na produção de enzimas digestivas para sustentar o rápido crescimento e desenvolvimento. Os altos níveis de FAI observados aos 7 dias refletem esta intensa atividade metabólica e absortiva, coincidindo com o estabelecimento inicial da microbiota intestinal (Brandt; Sampaio; Miuki, 2006). A elevada atividade da LPS-defosforilase sugere um papel crucial da FAI na modulação da resposta imune inata durante o primeiro contato com microrganismos, atuando na detoxificação de lipopolissacarídeos (LPS) e prevenindo inflamações exacerbadas (Bilski *et al.,* 2017).

Com o avanço da idade, verificou-se redução da atividade enzimática, possivelmente associada à adaptação fisiológica e ao equilíbrio da microbiota estabelecida. Esse padrão de decréscimo também foi descrito em outros modelos, nos quais a fosfatase alcalina intestinal

se mostrou mais ativa em fases iniciais da vida, diminuindo progressivamente, mas ainda exercendo função essencial de manutenção da homeostase intestinal (Narisawa *et al.,* 2007).

Além disso, a especificidade da FAI para substratos fosforilados, principalmente ortofosfato monoésteres, é bem estabelecida (MORTON, 1955). Essa característica confere seletividade à ação da enzima e permite compreender a diferença de resposta frente aos substratos avaliados (*p*-NPP e LPS). A redução de atividade observada nas idades posteriores pode também estar ligada a mecanismos de inibição competitiva ou à regulação negativa induzida por mudanças no metabolismo do hospedeiro e na composição microbiana intestinal (Bilski *et al.,* 2017).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atividade da fosfatase alcalina intestinal, tanto para o substrato artificial p-NPP quanto para o substrato biológico LPS, foi mais elevada aos 7 dias de idade, destacando a importância desta enzima durante a fase de maturação do sistema gastrointestinal e o rápido crescimento inicial dos frangos de corte.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, A. Gut reaction. **Nature**, v. 427, p. 284-286, 2004.

ALPERS, D. H.; ZHANG, Y.; AHNEN, D. J. Synthesis and parallel secretion of rat intestinal alkaline phosphatase and a surfactant-like particle protein. **American Journal Physiology**, v. 268, p. 1205-1214, 1995.

BILSKI, J. *et al.* The role of intestinal alkaline phosphatase in inflammatory disorders of gastrointestinal tract. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1-9, 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRANDT, C. T.; SAMPAIO, I. B. M.; MIUKI, C. Utilização de probióticos e prebióticos em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 909-916, 2006.

MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002.

MORTON, R. K. The substrate specificity and inhibition of alkaline phosphatases of cow's milk and calf intestinal mucosa. **Biochemical Journal**, v. 61, n. 2, p. 232-239, 1955.

NARISAWA, S. *et al.* A novel phosphatase upregulated in Akp3 knockout mice. American **Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.293, n.5, p.1068-1077, 2007.

PIZAURO, J. M.; CIANCIAGLINI, P.; LEONE, F. A. Hydrolysis of phosphomonoesters by chicken intestinal alkaline phosphatase. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 5, p. 641-644, 1995.

ROSTAGNO, H. S. *et al.* **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2011.

RUEDA, D. *et al.* Isolation and characterization of brush border membrane vesicles. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 454-462, 2007.

TINÔCO, I.F.F. Avicultura Industrial: Novos Conceitos de Materiais, Concepções e Técnicas Construtivas Disponíveis para Galpões Avícolas Brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.3, n.1, p.01-26, Jan. 2001.

TOLEDO, G. S. P. *et al.* Uso de aditivos alternativos aos antibióticos como promotores de crescimento em frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1760-1765, 2007.