EDIÇÃO 2025 – RESUMO EXPANDIDO

EFEITO DO pH SOBRE NA ATIVIDADE DE LPS-DEFOSFORILASE DA FOSFATASE ALCALINA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE

EFFECT OF pH ON THE ACTIVITY OF LPS-DEPHOSPHORYLASE OF INTESTINAL ALKALINE PHOSPHATASE IN BROILERS

Ana Júlia Batista da Silva [I]
Gabriella Cavazzini Pavarina [II]
Miguel Frederico Fernandez Alarcon [III]
Joao Martins Pizauro Junior [IV]
Luiz Flávio José dos Santos [V]

RESUMO

A fosfatase alcalina intestinal (FAI) é crucial na detoxificação de LPS bacterianos em aves. Este estudo investigou o efeito do pH na atividade de LPS-defosforilase da FAI em frangos de corte. Extratos jejunais de aves Cobb-500 foram submetidos a hidrólise de LPS em pH variando de 6,5 a 10,5. Os resultados demonstraram que a atividade enzimática é altamente dependente do pH, com pico máximo de eficiência em pH 9,0. Esta condição alcalina ótima corrobora a natureza fisiológica da FAI e seu papel essencial na barreira intestinal, destacando seu mecanismo de defesa ao prevenir inflamações através da desfosforilação eficiente de LPS.

Palavras-chave: LPS-defosforilase intestinal; probióticos; avicultura; nutrição animal.

ABSTRACT

Intestinal alkaline phosphatase (IAP) is crucial for the detoxification of bacterial LPS in poultry. This study investigated the effect of pH on the LPS dephosphorylase activity of IAP in broilers. Jejunal extracts from Cobb-500 birds were subjected to LPS hydrolysis at pH levels ranging from 6.5 to 10.5. The results demonstrated that enzymatic activity is highly pH-dependent, with peak efficiency at pH 9.0. This optimal alkaline condition corroborates the physiological nature of IAP and its essential role in the intestinal barrier, highlighting its defense mechanism by preventing inflammation through efficient LPS dephosphorylation.

Keywords: intestinal lps-defosforilase; probiotics; poultry farming; animal nutrition.

Data de submissão: 03/09/2025.
Data de aprovação: 20/10/2025.
DOI: https://doi.org/10.52138/sitec.v5i1.473

[I] Técnico, Etec – Bento Carlos Botelho do Amaral, ana.silva5716@etec.sp.gov.br
[II] Mestre, Secretaria Estadual de Educação de São Paulo, g.cavazzini12@gmail.com
[III] Doutor, Laboratorio Pathovet - Ribeirão Preto, miguelffa@hotmail.com
[IV] Doutor, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp – Jaboticabal, j.pizauro@unesp.br
[V] Doutor, Faculdade de Tecnologia de Ribeiro Preto, luiz.santos167@fatec.sp.gov.br

EDIÇÃO 2025 – RESUMO EXPANDIDO

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira representa um dos setores mais avançados em termos tecnológicos, sustentada por ganhos expressivos em genética, nutrição e manejo. A produção de frangos de corte ocupa posição estratégica, com elevada participação no mercado interno e destaque internacional nas exportações (ABPA, 2017). Entretanto, a busca por maior eficiência produtiva impõe desafios relacionados à nutrição, saúde intestinal e alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento, cujo uso indiscriminado levou ao aumento da resistência bacteriana (Toledo *et al.,* 2007). Nesse contexto, alternativas como probióticos, prebióticos e óleos essenciais vêm sendo avaliadas para manter a homeostase intestinal (Fuller, 1989).

No trato gastrointestinal das aves, o equilíbrio entre microbiota residente e agentes patogênicos desempenha papel central na saúde e desempenho produtivo. Os enterócitos intestinais participam da digestão final, da absorção de nutrientes e do transporte reverso para o lúmen (Boleli; Thimotheo, 2017), enquanto a microbiota intestinal contribui na fermentação de substratos, síntese de vitaminas e prevenção da colonização por patógenos. Estudos recentes demonstram que a diversidade microbiana intestinal é determinante para a resposta imune e para a prevenção de inflamações crônicas (Abbott, 2004).

Dentre os mecanismos fisiológicos de defesa, a fosfatase alcalina intestinal (FAI) exerce papel central ao desfosforilar lipopolissacarídeos (LPS), reduzindo sua toxicidade e prevenindo inflamações exacerbadas (Santos *et al.,* 2022). A detoxificação do LPS decorre da remoção de grupamentos fosfato do lipídio A, reduzindo em até 100 vezes a sua atividade pró-inflamatória. Além disso, a FAI contribui para a manutenção da barreira intestinal, regula o pH luminal e favorece a homeostase microbiana (Bilski *et al.,* 2017).

Assim o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito do pH sobre a atividade de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal de frangos de corte.

2 METODOLOGIA DA PESQUISA

Essa seção apresenta os procedimentos metodológicos da pesquisa.

2.1 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.

2.2 Obtenção do extrato enzimático

Aos 42 dias, seis aves foram abatidas após 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

SITEC Simpósio de Tecnologia Fatec Jaboticabal
Fatec Jaboticabal Nilo De Stéfani · CPS Centro Paula Souza
EDIÇÃO 2025 – RESUMO EXPANDIDO

centrifugação diferencial modificado de Rueda e Colaboradores (2007), como esquematizado na Figura 1.

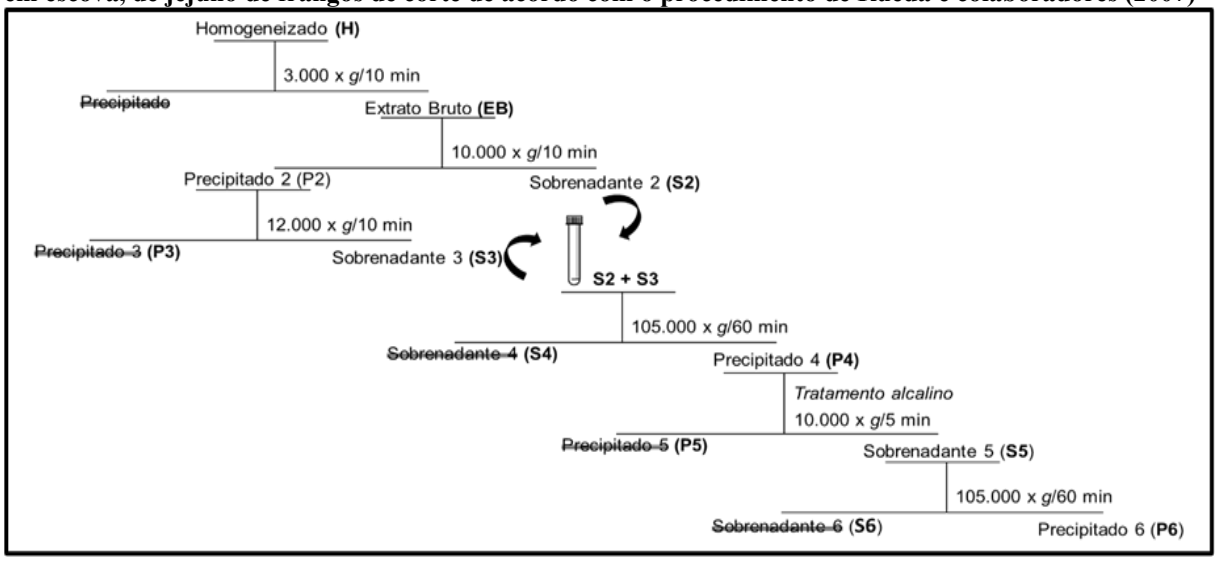
2.3 Determinação da atividade LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal

A atividade de LPS-defosforilase foi determinada a 37°C pela quantificação do fosfato inorgânico liberado da hidrólise de LPS (1,5 mg/mL) em 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), baseado na 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.

2.4 Efeito do pH sobre a atividade de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal

O estudo do efeito do pH sobre a atividade de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal foi realizado utilizando os tampões TRIS.HCl (pH 6,5 – 8,5) e AMPOL (pH 8,5 – 10,5) em concentrações de 105 mM. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio de reação, e interrompida com 0,1 mL de TCA 50% (p/v).

Figura 1 - Modificação do esquema do método de obtenção da fosfatase alcalina ligada à membra de borda em escova, de jejuno de frangos de corte de acordo com o procedimento de Rueda e colaboradores (2007)



As frações em tachado duplo ~~~ simboliza que foram descartadas durante o processo de centrifugações diferenciais. O Tratamento alcalino foi realizado com a ressuspensão do pellet do P4 (com bastão de vidro e posteriormente no PotterTM) em tampão 10 mM TRIS.HCl pH 7,3 contendo NaCl 0,17 M, MgCl2 10 mM e CaCl2 1 mM. A suspensão resultante foi diluída 3,5 vezes com tampão 0,2 M TRIS.HCl (pH 7,5) com MgCl2 10 mM e CaCl2 1 mM. As proporções foram ajustadas para ter um volume final equivalente à metade do volume de S2 e S3. O P6 (amostra final) foi ressuspendido em tampão 0,2 M TRIS.HCl pH 7,5 com MgCl2 10 mM e CaCl2 1 mM.
Fonte: elaboração própria (2025)

EDIÇÃO 2025 – RESUMO EXPANDIDO

2.5 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.

2.6 Análise dos resultados

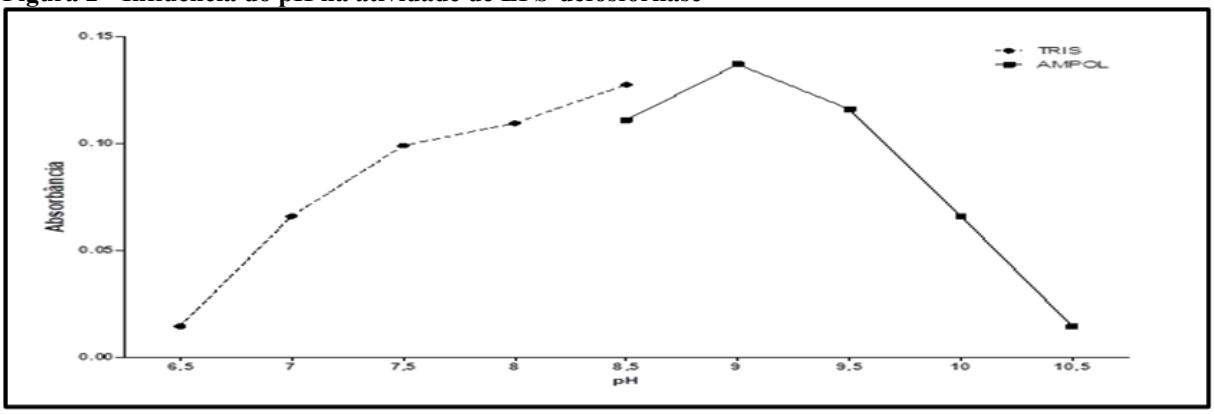
Os dados foram analisados no software SAS System 9.0, considerando três repetições. Foram aplicados testes de homocedasticidade e normalidade, seguidos de análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo do efeito do pH sobre a atividade de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina revelou que o pH ótimo aparente de hidrólise do LPS é 9,0 (Figura 2), sendo esse pH o escolhido para os demais ensaios enzimáticos. Em estudos semelhantes em Lithobates catesbeianus, o pH ótimo aparente também foi 9,0 (Santana, 2015).

Os resultados obtidos demonstraram que a atividade da fosfatase alcalina intestinal (FAI) é fortemente influenciada pelo pH, apresentando maior eficiência em condições alcalinas, como descrito para enzimas dessa classe (Morton, 1955). Essa característica confirma o papel fisiológico da FAI no lúmen intestinal, ambiente sujeito a variações de pH, principalmente entre duodeno e jejuno.

Figura 2 - Influência do pH na atividade de LPS-defosforilase



Fonte: elaboração própria (2025)

A análise da atividade de LPS-defosforilase mostrou que a FAI pode desempenhar papel relevante na detoxificação de endotoxinas bacterianas, corroborando achados prévios em modelos animais. Em zebrafish, por exemplo, a ausência de FAI resultou em inflamação intestinal exacerbada, evidenciando sua importância na tolerância imunológica (Bates *et al.,* 2007). Em ratos e camundongos, a deficiência da enzima foi associada a maior permeabilidade intestinal, endotoxemia e desenvolvimento de síndrome metabólica (Kaliannan *et al.,* 2013).

Nos frangos de corte, a regulação da FAI pode estar relacionada tanto à dieta quanto ao microbioma intestinal. Estudos demonstram que a privação de fósforo aumenta a digestibilidade do fitato e pode modular a expressão de enzimas intestinais (Moore; Veum, 1983). Além disso, a presença de microbiota diversificada e equilibrada estimula a atividade da FAI, favorecendo a homeostase intestinal (Santos *et al.,* 2022). Assim, variações no pH intestinal não apenas influenciam a atividade enzimática, mas também modulam a interação com a microbiota e o processo de detoxificação de LPS.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a atividade de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina de frangos de corte tem seu pH ótimo em nove, informação que pode contribuir para a compreensão do papel da FAI como mediadora da saúde intestinal de frangos de corte, destacando seu potencial como alvo de estratégias nutricionais que visem otimizar o desempenho produtivo e reduzir a necessidade de antibióticos na produção avícola.

REFERÊNCIAS

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

ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. Relatório anual 2017.

BATES, J. M. et al. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish. **Cell Host Microbe**, v.2, p.371-382, 2007.

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.

BOLELI, I. C.; THIMOTHEO, M., Estrutura funcional do trato gastrointestinal: da percepção à absorção. In: MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. Jaboticabal: Funep, 2017. chap. 5, p. 138-170.

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.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol**., v.66, p.365-378, 1989.

KALIANNAN, K. et al. Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. **PNAS**, v.110, p.7003-7008, 2013.

MOORE, R.; VEUM, T. Adaptive increase in phytate digestibility by phosphorus-deprived rats. **Br. J. Nutr**., v.49, p.145-152, 1983.

MORTON, R. The substrate specificity and inhibition of alkaline phosphatases of cow's milk and calf intestinal mucosa. **Biochem. J**., v.59, p.232-239, 1955.

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.

SANTANA, C. C. **Atividade de fosfomonohidrolases presentes em fígado de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante a metamorfose**. 2015. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2015.

SANTOS, G. M. et al. Intestinal alkaline phosphatase: a review of this enzyme role in the intestinal barrier function. **Microorganisms**, v.10, p.746, 2022.

TOLEDO, G. S. P. et al. Alternativas aos antibióticos como promotores de crescimento de aves. **Arch. Vet. Sci**., v.12, p.9-19, 2007.