EDIÇÃO 2025 – RESUMO EXPANDIDO

# EFEITO DO pH SOBRE NA ATIVIDADE DE *p*-NFFase DA FOSFATASE ALCALINA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE

## *EFFECT OF pH ON THE ACTIVITY OF p-NFFase OF INTESTINAL ALKALINE PHOSPHATASE IN BROILERS*

Gabriel Souza Silva [I]
Gabriella Cavazzini Pavarina [II]
Miguel Frederico Fernandez Alarcon [III]
João Martins Pizauro Junior [IV]
Luiz Flávio José dos Santos [V]

## RESUMO

A fosfatase alcalina intestinal (FAI) é crucial para a saúde intestinal de aves, atuando na detoxificação de LPS bacterianos. Este estudo avaliou o efeito do pH na atividade da FAI em frangos de corte. Utilizando extrato jejunal de aves Cobb-500, a atividade enzimática foi medida pela hidrólise do *p*-NFF em pH variando de 7,0 a 12,0. Os resultados mostraram que a atividade da FAI é altamente dependente do pH, com pico máximo de eficiência em pH 11,0. Este ótimo alcalino corrobora a natureza da enzima e reforça seu papel fisiológico na barreira intestinal, destacando sua importância na prevenção de respostas inflamatórias pela detoxificação de substratos nocivos.

**Palavras-chave:** fosfatase alcalina intestinal; avicultura; nutrição animal.

## ABSTRACT

Intestinal alkaline phosphatase (IAP) is crucial for the intestinal health of poultry, acting in the detoxification of bacterial LPS. This study evaluated the effect of pH on IAP activity in broilers. Using Cobb-500 poultry jejunal extract, enzyme activity was measured by the hydrolysis of *p*-NFF at pH levels ranging from 7.0 to 12.0. The results showed that IAP activity is highly pH-dependent, with peak efficiency at pH 11.0. This alkaline optimum corroborates the enzyme's nature and reinforces its physiological role in the intestinal barrier, highlighting its importance in preventing inflammatory responses by detoxifying harmful substrates.

**Keywords:** intestinal alkaline phosphatase; poultry farming; animal nutrition.

Data de submissão: 03/09/2025.
Data de aprovação: 20/10/2025
DOI: https://doi.org/10.52138/sitec.v5i1.475

[I] Técnico, Etec – Bento Carlos Botelho do Amaral, gabriel.silva3355@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 Ribeirão Preto, luiz.santos167@fatec.sp.gov.br

EDIÇÃO 2025 – RESUMO EXPANDIDO

## 1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é um setor altamente desenvolvido e vital para o agronegócio, sendo o Brasil um dos maiores produtores e exportadores mundiais de carne de frango (ABPA, 2017). Como a alimentação representa até 70% dos custos de produção (Buteri, 2003), a busca por estratégias para melhorar a eficiência alimentar é uma prioridade.

A saúde intestinal, mediada pela microbiota, é crucial para o desempenho das aves (Abbott, 2004). Nesse contexto, a fosfatase alcalina intestinal (FAI) surge como uma enzima fundamental. Ela atua desintoxicando lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias, prevenindo respostas inflamatórias e preservando a integridade da barreira intestinal (Santos et al., 2022). Sua atividade é um importante marcador de saúde intestinal e é influenciada por fatores nutricionais, como dietas pobres em fósforo ou ricas em gordura (Moore; Veum, 1983). Diversos estudos evidenciam que a atividade da FAI varia conforme fatores fisiológicos, nutricionais e ambientais. Trabalhos clássicos indicam que dietas pobres em fósforo ou ricas em gordura podem modular a expressão da enzima (Narisawa *et al*., 2007). Além disso, há evidências de que a FAI está relacionada ao metabolismo lipídico, favorecendo a absorção de ácidos graxos e influenciando o transporte de quilomícrons (Narisawa *et al*., 2007).

No âmbito da saúde intestinal, a enzima atua como importante marcador de integridade da barreira epitelial, sendo associada à proteção contra inflamações, doenças metabólicas e distúrbios gastrointestinais (Santos *et al*., 2022). Modelos experimentais demonstram que a deficiência da FAI pode aumentar a susceptibilidade a endotoxemia, síndrome metabólica e disbiose (Bilski *et al*., 2017). Portanto, compreender a influência do pH sobre a atividade da FAI em frangos de corte é essencial para a formulação de estratégias nutricionais que favoreçam o equilíbrio intestinal, a eficiência produtiva e a saúde das aves.

Assim o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito do pH sobre a atividade de *p*-NFFase 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

Simpósio de Tecnologia Fatec Jaboticabal
EDIÇÃO 2025 – RESUMO EXPANDIDO

nitrogênio líquido e freezer a -70°C. As amostras homogeneizadas seguiram o esquema de centrifugação diferencial modificado de Rueda *et al*. (2007), como esquematizado na Figura 1.

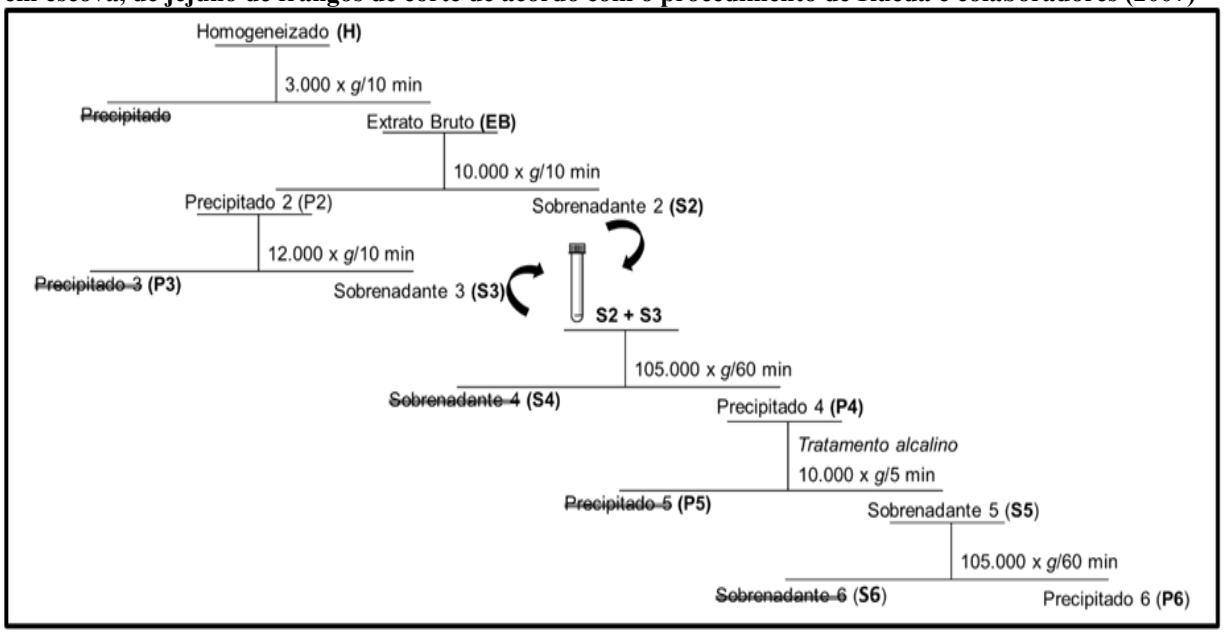
## 2.3 Determinação da atividade *p*-NFFásica da fosfatase alcalina intestinal

O estudo determinou a atividade da enzima fosfatase alcalina intestinal (FAI) por meio da hidrólise do substrato *p*-NFF, que forma o produto *p*-nitrofenolato (ε= 17600 M-1cm-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.

## 2.4 Estudo do efeito do pH sobre a atividade *p*-NFFásica da fosfatase alcalina intestinal

Para investigar o efeito do pH na atividade da FAI, foram utilizados três tampões em diferentes faixas de pH (7.0 a 12.0): TRIS.HCl (pH 7 – 8,5), AMPOL (pH 8,5 – 11) e Glicina (pH 11 – 12).

**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, $MgCl_2$ 10 mM e $CaCl_2$ 1 mM. A suspensão resultante foi diluída 3,5 vezes com tampão 0,2 M TRIS.HCl (pH 7,5) com $MgCl_2$ 10 mM e $CaCl_2$ 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 $MgCl_2$ 10 mM e $CaCl_2$ 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.

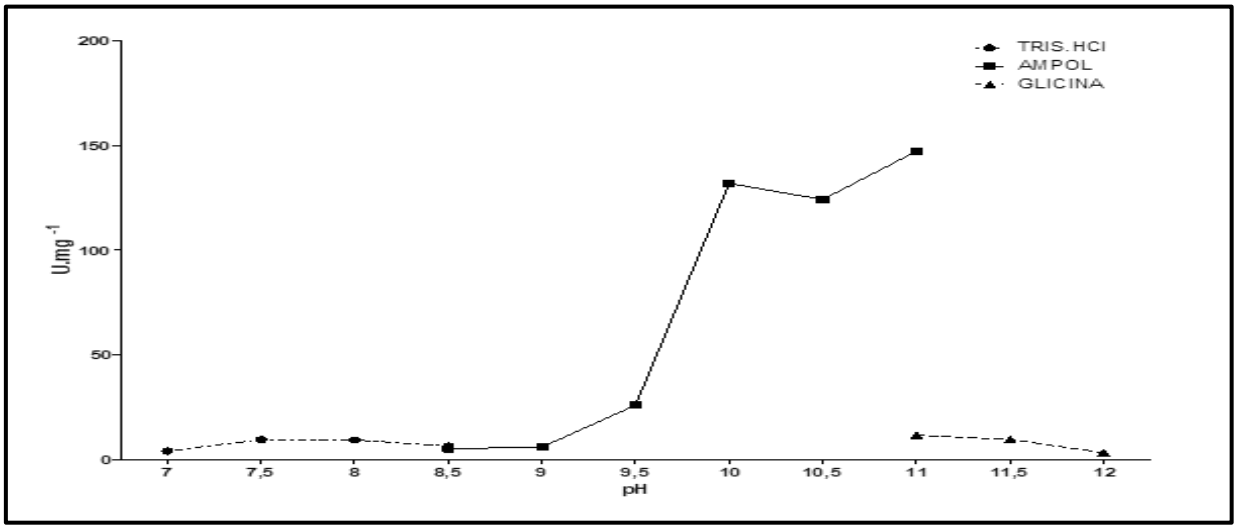
## 2.6 Análise dos resultados

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

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 2, e demonstraram que a atividade da fosfatase alcalina intestinal (FAI) em frangos de corte apresenta variação significativa em função do pH e da espécie tamponante, com desempenho enzimático mais elevado em condições alcalinas. Esse perfil confirma a literatura, que descreve a FAI como uma enzima de ótima atuação em pH básico (Bilski *et al*., 2017). A elevação da atividade enzimática em pH próximo a 9,0 reforça a sua participação como reguladora da homeostase intestinal.

**Figura 2 - Média dos resultados do efeito do pH sobre a atividade de *p*-NFFase da fosfatase alcalina intestinal**




**Fonte: elaboração própria (2025)**

Observou-se que alterações no pH podem comprometer a capacidade da enzima em defosforilar substratos como o *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NFFase), o que impacta diretamente na detoxificação do lipopolissacarídeo (LPS). Trabalhos com modelos animais apontam que a ausência ou baixa atividade da FAI aumenta a suscetibilidade a respostas inflamatórias exacerbadas induzidas pelo LPS (Goldberg *et al*., 2008). Esse fenômeno também foi associado à maior translocação bacteriana e maior risco de endotoxemia (Santos *et al*., 2022).

EDIÇÃO 2025 – RESUMO EXPANDIDO

Estudos prévios indicam que dietas ricas em gordura aumentam a expressão da enzima em diferentes regiões do intestino (Narisawa *et al*., 2007). Essa indução sugere que a FAI exerce papel adicional no metabolismo lipídico, favorecendo o transporte de ácidos graxos e modulando a formação de quilomícrons. Resultados similares foram relatados em modelos de camundongos, nos quais a suplementação exógena da enzima preveniu o desenvolvimento da síndrome metabólica associada a dietas hiperlipídicas (Kaliannan *et al*., 2013).

No presente estudo, o perfil de atividade da FAI em função do pH corrobora a ideia de que a enzima é fundamental na manutenção da barreira intestinal. Além de atuar sobre o LPS, a FAI também está relacionada à regulação da composição da microbiota intestinal, favorecendo bactérias comensais e reduzindo a colonização por microrganismos patogênicos (Santos *et al*., 2022). Essa ação antimicrobiana indireta pode estar associada à capacidade da enzima de modular o microambiente intestinal, especialmente no controle do pH luminal e na neutralização de metabólitos tóxicos (Bates *et al*., 2007).

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a atividade de *p*-NFFase da fosfatase alcalina de frangos de corte tem seu pH ótimo aparente em 11, informação que podem ser importantes não apenas para o desempenho digestivo e absortivo das aves, mas também a resposta imunológica frente a desafios infecciosos.

## REFERÊNCIAS

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual 2017.** São Paulo: Associação Brasileira de Proteína Animal, 2017.

BATES, J. M. et al. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. **Cell Host & Microbe**, v. 2, n. 6, 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.

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.

BUTERI, R. D. Custo da alimentação na avicultura de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2003.

GOLDBERG, R. F. et al. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. **PNAS**, v. 105, n. 9, p. 3551-3556, 2008.

KALIANNAN, K. et al. Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. **PNAS**, v. 110, n. 17, p. 7003-7008, 2013.

MOORE, R. J.; VEUM, T. L. Adaptive increase in phytate digestibility by phosphorus-deprived rats and the relationship of intestinal phytase and alkaline phosphatase to phytate utilization. **British Journal of Nutrition**, v. 49, p. 145-156, 1983.

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. G1068-G1077, 2007.

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.

SANTOS, G. M. et al. Intestinal Alkaline Phosphatase: A Review of This Enzyme Role in the Intestinal Barrier Function. **Microorganisms**, v. 10, n. 746, p. 1-15, 2022.