EDIÇÃO 2025 – RESUMO EXPANDIDO

EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE REAÇÃO NA ATIVIDADE DE *p*-NFFase DA FOSFATASE ALCALINA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE

EFFECT OF TEMPERATURE AND REACTION TIME ON THE ACTIVITY OF p-NFFase OF INTESTINAL ALKALINE PHOSPHATASE IN BROILERS

Stéfani Cristina Ambrozino Muniz [I]
Gabriella Cavazzini Pavarina [II]
Miguel Frederico Fernandez Alarcon [III]
João Martins Pizauro Junior [IV]
Luiz Flávio José dos Santos [V]

RESUMO

Este estudo investigou a atividade da Fosfatase Alcalina Intestinal (FAI) em frangos de corte, enzima crucial para a detoxificação e integridade intestinal. A análise da hidrólise do substrato *p*-NFF revelou que a atividade da FAI é altamente sensível à temperatura e ao tempo de reação. A máxima eficiência foi alcançada em condições fisiológicas intermediárias (30-50°C), enquanto temperaturas mais altas ou tempos prolongados levaram à desnaturação e perda de atividade. Os resultados confirmam o papel adaptativo da FAI na digestão e defesa, fornecendo insights valiosos para o desenvolvimento de estratégias nutricionais que visam a saúde intestinal e a produtividade avícola.

Palavras-chave: fosfatase alcalina intestinal; probióticos. Avicultura; nutrição animal.

ABSTRACT

This study investigated the activity of Intestinal Alkaline Phosphatase (IAP) in broilers, a crucial enzyme for detoxification and intestinal integrity. Analysis of p-NFF substrate hydrolysis revealed that IAP activity is highly sensitive to temperature and reaction time. Maximum efficiency was achieved under intermediate physiological conditions (30-50°C), while higher temperatures or prolonged reaction times led to denaturation and loss of activity. The results confirm the adaptive role of IAP in digestion and defense, providing valuable insights for the development of nutritional strategies targeting intestinal health and poultry productivity.

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

Data de submissão: 03/09/2025.
Data de aprovação: 20/10/2025.
DOI: https://doi.org/10.52138/sitec.v5i1.480

[I] Técnico, Etec Bento Carlos Botelho do Amaral, stefani.muniz@etec.com.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, j.pizauro@unesp.br
[V] Doutor, Fatec – Ribeirão Preto, luiz.santos167@fatec.sp.gov.br

EDIÇÃO 2025 – RESUMO EXPANDIDO

1 INTRODUÇÃO

A avicultura moderna consolidou-se como um setor dinâmico do agronegócio, com o Brasil destacando-se como segundo maior produtor e maior exportador mundial de carne de frango (ABPA, 2017). A busca por estratégias nutricionais eficientes tornou-se prioritária, considerando que a alimentação pode representar até 70% dos custos de produção (Buteri, 2003). Nesse cenário, aditivos alimentares emergem como alternativas cruciais para otimizar o desempenho zootécnico, com probióticos e óleos essenciais sendo investigados como substitutos aos antibióticos – estes últimos associados ao risco de resistência bacteriana (Nunes, 2008).

O equilíbrio da microbiota intestinal é fundamental para a saúde e o crescimento das aves, sendo o trato gastrointestinal caracterizado por uma compartimentalização funcional que amplia a eficiência digestiva por meio de vilosidades e criptas (Boleli; Thimotheo, 2017). A colonização por uma comunidade microbiana diversificada influencia processos digestivos, imunológicos e metabólicos (ABBOTT, 2004). Entre os mecanismos de defesa endógenos, destaca-se a Fosfatase Alcalina Intestinal (FAI), enzima que desfosforila lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, reduzindo sua toxicidade e prevenindo respostas inflamatórias exacerbadas, uma vez que mesmo concentrações mínimas de LPS podem ser deletérias (Kirsten, 2008).

Estudos recentes reforçam o papel da FAI na modulação da resposta inflamatória, preservação da barreira epitelial e prevenção da translocação bacteriana (Santos *et al.,* 2022). Sua deficiência está associada a maior susceptibilidade a infecções, disbiose e síndrome metabólica em modelos animal. Além disso, a FAI relaciona-se à digestão e absorção lipídica, evidenciando seu papel multifuncional no metabolismo intestinal (Narisawa *et al.,* 2007), o que a torna alvo promissor para estratégias nutricionais que visem à saúde intestinal e à produtividade avícola.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da temperatura e do tempo de reação 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

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.

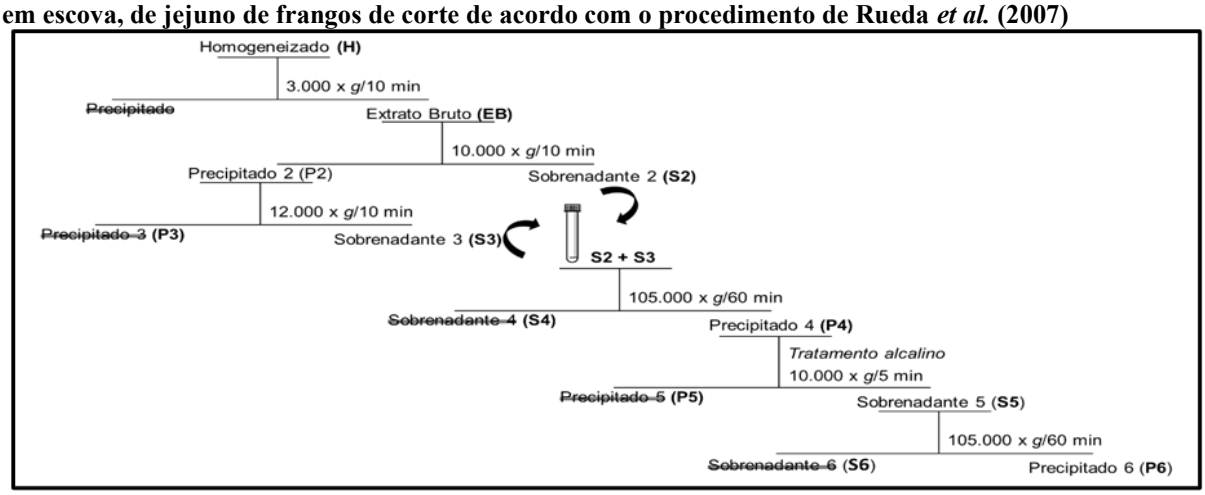
2.3 Determinação da atividade p-NPPásica da fosfatase alcalina intestinal

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 da temperatura e do tempo de reação sobre a atividade p-NFFásica da fosfatase alcalina intestinal

Para avaliar o efeito da temperatura e tempo de reação sobre a atividade enzimática foi realizado utilizando amostras homogeneizadas em solução tampão TRIS.HCl 5 mM, pH 7,3 contendo NaCl 0,17 M; CaCl2 10 mM e MgCl2 10 µM, e armazenadas a -70ºC. As atividades foram testadas em temperaturas de 30, 35, 37, 40, 42, 45 e 50ºC, nos tempos de 1, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos.

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 *et al.* (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 o 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: autoria 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.

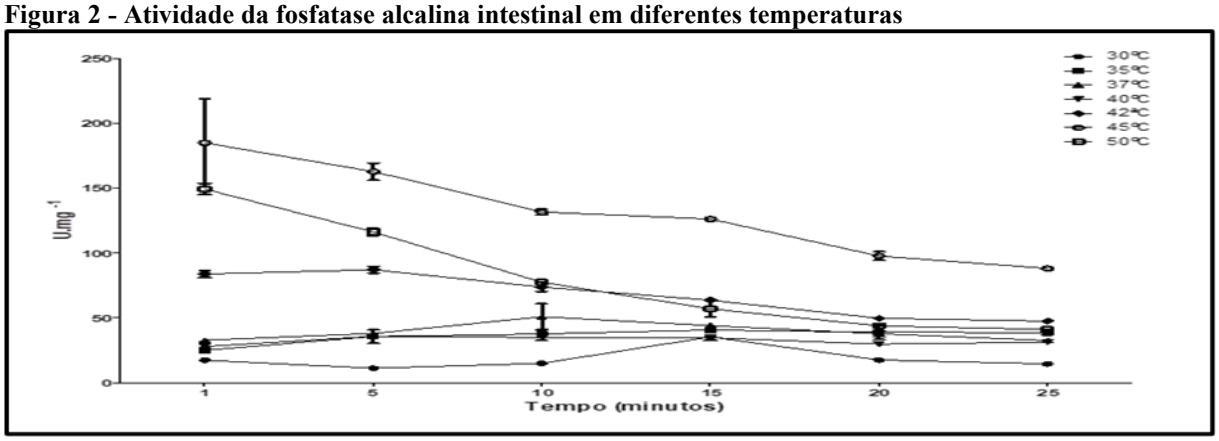
2.6 Análise dos Resultados

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 da atividade de *p*-NFFase da FAI em função da temperatura e do tempo de reação estão apresentados na figura 2, a análise do gráfico demonstra que a atividade enzimática da Fosfatase Alcalina Intestinal em frangos de corte foi influenciada de forma significativa tanto pela temperatura quanto pelo tempo de reação. Observou-se que temperaturas mais elevadas favoreceram inicialmente maior atividade, entretanto, quando prolongadas, ocasionaram declínio devido à desnaturação proteica, fenômeno característico de enzimas dependentes de estabilidade conformacional (Morton, 1955). É importante ressaltar que a temperatura corporal de frangos de corte varia entre 41 – 42ºC sofrendo oscilações (para mais ou para menos) conforme as variações de temperatura do ambiente. O estresse calórico, por exemplo, pode interferir drasticamente na temperatura corpórea desses animais gerando prejuízos (Macari; Furlan; Gonzales, 2002).

Figura 2 - Atividade da fosfatase alcalina intestinal em diferentes temperaturas



Fonte: autoria própria (2025)

A análise cinética indicou que a atividade ótima ocorreu em temperaturas intermediárias, compatível com a literatura que descreve a FAI como enzima adaptada às condições fisiológicas do intestino delgado (Santos *et al.,* 2022). Esses resultados reforçam achados prévios em modelos animais, nos quais a atividade de fosfatase alcalina intestinal foi

fundamental para a detoxificação do LPS bacteriano e prevenção de respostas inflamatórias exacerbadas (Goldberg *et al.,* 2008).

Além de seu papel clássico na digestão, a FAI mostrou-se essencial na regulação da microbiota intestinal. A enzima atua na preservação da integridade da barreira epitelial e na modulação da inflamação, prevenindo disbiose e suas consequências metabólicas (Santos *et al.,* 2022). Em frangos de corte, esse papel é de particular interesse, uma vez que a saúde intestinal está diretamente relacionada à eficiência alimentar, imunidade e bem-estar animal.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a atividade de *p*-NFFase da fosfatase alcalina de frangos de corte tem faixas de temperatura intermediárias, os achados que sugerem que a FAI, além de atuar como enzima digestiva, pode desempenhar função estratégica na defesa da mucosa entérica e no metabolismo de frangos de corte.

REFERÊNCIAS

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA) **Relatório Anual 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.

BOLELI, I. C.; THIMOTHEO, M. **Trato digestório de aves: estrutura e função**. 2017.

BUTERI, C. B. **Custos de produção de frango de corte**. 2003.

GOLDBERG, R. F. *et al.* Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. **PNAS**, 2008.

KIRSTEN, T. B. **Avaliação comportamental e neuroquímica da prole masculina de ratas exposta pré-natalmente ao lipopolissacarídeo**. 2008. 123 f. Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. 375 p.

MORTON, R. K. The substrate specificity and inhibition of alkaline phosphatases. **Biochemical Journal**, 1955.

NARISAWA, S. *et al.* A novel phosphatase upregulated in Akp3 knockout mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 2007.

NUNES, R. **Uso de óleos essenciais em dietas de frangos de corte**. 2008.

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**, 2022.