




C A P Í T U L O 2

AVALIAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM PROBIÓTICOS E/OU ÓLEOS ESSENCIAIS

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.782122512082>

Gabriella Cavazzini Pavarina

Secretaria da Educação do Estado de São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/8262436320266804>

Miguel Frederico Fernandez Alarcon

Laboratorio Pathovet - Ribeirão Preto - São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/4190145249128488>

Caroline Carla Santana

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp - Jaboticabal – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/8934181667313550>

Luiz Flávio José dos Santos

Faculdade de Tecnologia de Ribeiro Preto – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/5888302973425312>

Renato Luis Furlan

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp - Jaboticabal – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/0806409484159642>

Joao Martins Pizauro Junior

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp - Jaboticabal – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/3958124498479090>

RESUMO: Este capítulo objetiva caracterizar e avaliar as atividades de fosfomonohidrolase e de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal em frangos de corte Cobb-500 submetidos a dietas com probióticos, óleos essenciais e antibiótico promotor de crescimento. Padronizações de ensaio foram conduzidas e, posteriormente, determinadas as atividades enzimáticas. A maior atividade foi observada aos 7 dias, associada ao desenvolvimento gastrointestinal. A dieta com avilamicina apresentou valores mais expressivos aos 42 dias, sugerindo modulação da microbiota intestinal.

PALAVRAS-CHAVE: Fosfatase alcalina intestinal. Probióticos. Óleos essenciais. Avicultura. Nutrição animal.

EVALUATION OF INTESTINAL ALKALINE PHOSPHATASE IN BROILER CHICKENS FED WITH PROBIOTICS AND/OR ESSENTIAL OILS

ABSTRACT: This chapter aimed to characterize and evaluate phosphomonoesterase and LPS-dephosphorylase activities of intestinal alkaline phosphatase in Cobb-500 broiler chickens fed diets containing probiotics, essential oils, and an antibiotic growth promoter. Optimal assay conditions were standardized, and enzymatic activities were determined. The highest activity was observed at 7 days, related to gastrointestinal development. Avilamycin supplementation showed significant values at 42 days, suggesting modulation of the intestinal microbiota.

KEYWORDS: Intestinal alkaline phosphatase. Probiotics. Essential oils. Poultry. Animal nutrition.

INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é uma das atividades mais avançadas tecnologicamente no setor agropecuário, resultado de 40 anos de avanços em genética, nutrição, manejo e sanidade (Tinôco, 2001). O Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de carne de frango, com uma produção de 12,90 milhões de toneladas em 2016. Neste cenário, a dieta alimentar representa até 70% do custo total de produção, impulsionando a busca por aditivos que melhorem a eficiência alimentar, o ganho de peso e o crescimento dos animais.

Historicamente, os antibióticos foram amplamente utilizados como promotores de crescimento (AGP), mostrando-se eficazes especialmente em condições de campo com desafios sanitários. Seus mecanismos incluem a inibição de infecções subclínicas, a redução de metabólitos que suprimem o crescimento, a diminuição da competição por nutrientes entre o hospedeiro e a microbiota, e o aumento da absorção de nutrientes.

Contudo, o uso indiscriminado dos antibióticos desde a década de 50 acarretou o desenvolvimento de resistência bacteriana, principalmente em patógenos como *Salmonella* e *Campylobacter coli*, o que levou à restrição de seu uso. Como resultado, a pesquisa científica se intensificou na busca por alternativas como probióticos, que atuam por exclusão competitiva (Fuller, 1989), e óleos essenciais, que possuem atividade antimicrobiana seletiva (Toledo *et al.*, 2007).

O foco dessas estratégias é a manutenção da saúde e do equilíbrio do trato gastrointestinal (TGI), um ecossistema dinâmico e complexo (Abbott, 2004). Nas aves, o TGI só se completa morfológicamente após a segunda semana de vida e, desde o nascimento, é colonizado por uma microbiota heterogênea. Esses microrganismos

residentes estabelecem uma relação de comensalismo ou mutualismo com o hospedeiro, auxiliando na fermentação de substratos, na produção de vitaminas e aminoácidos e, crucialmente, dificultando a colonização por patógenos transitórios (Boleli; Thimotheo, 2017).

O equilíbrio deste ecossistema entérico, que envolve fatores genéticos, a composição da microbiota e os componentes da dieta, é essencial para a saúde intestinal e o bom desempenho da ave. Fatores como estresse, uso de antibióticos ou má qualidade da dieta podem romper essa homeostase, permitindo a instalação de patógenos e causando desequilíbrio (Abbott, 2004).

Além dos aditivos exógenos, o próprio hospedeiro possui mecanismos para regular a microbiota e se defender. Um desses mecanismos é a fosfatase alcalina intestinal (FAI), uma enzima que atua na detoxificação do lipopolissacarídeo (LPS) (Geddes; Philpott, 2008). A FAI é uma ectoenzima que em diferentes organismos tem sido encontrada associada à membrana das bordas em escova das microvilosidades dos enterócitos (Akiba *et al.*, 2007). Embora baixos níveis de fosfatase alcalina intestinal sejam secretados na circulação sanguínea e no lúmen do intestino (Nakano *et al.*, 2009), a enzima é expressa exclusivamente na superfície apical das microvilosidades das membranas dos enterócitos e, tem sido considerada um marcador da diferenciação da cripta do vilo (Alpers; Zhang; Ahnen, 1995).

Além de sua atuação como fosfomonohidrolase, a fosfatase alcalina intestinal também participa no transporte de lipídeos intestinal; da regulação da secreção de bicarbonato no duodeno, controlando o pH da superfície; da redução da passagem de bactérias através da mucosa intestinal, conversora do LPS tóxico em atóxico e, consequentemente evitando a sepsia (Narizawa *et al.*, 2003; Geddes; Philpott, 2008; Nakano *et al.*, 2009; Lallés, 2010).

A função da FAI que tem recebido considerável atenção, atualmente, é a sua atuação na detoxificação do LPS (Geddes; Philpott, 2008). Esta característica representa uma importante contribuição para estudos na área de saúde animal, destacando assim, a importância do papel fisiológico da enzima no processo de diminuição do fator de virulência de bactérias intestinais por meio da defosforilação do LPS, molécula altamente tóxica das bactérias gram-negativas (Geddes; Philpott, 2008), que causa efeitos deletérios para os organismos vivo em concentrações menores que 1 nM. A FAI diminui o fator de virulência dessas bactérias por meio da defosforilação do LPS, convertendo-o em uma forma inativa e contribuindo para a homeostase intestinal (Narizawa *et al.*, 2003).

Diante do exposto, o presente estudo poderá contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na atuação da fosfatase alcalina na regulação dos processos digestivos, metabólicos e patológicos do trato gastrointestinal de frangos de corte, assim como da importância das dietas alimentares no mecanismo de detoxificação do LPS (Lallés, 2010).

OBJETIVOS

Caracterizar e avaliar as atividades de fosfomonohidrolase e de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal de frangos Cobb-500 submetidos a diferentes tratamentos nutricionais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento Experimental e Obtenção do Material Biológico

Todos os protocolos de manipulação e sacrifício animal foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV (protocolo Nº 008179/13), em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal. As amostras intestinais utilizadas são provenientes do experimento de tese de Alarcon (2015).

Foram utilizados frangos de corte machos da linhagem Cobb-500, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições cada. Os tratamentos consistiram em cinco dietas distintas: (1) Dieta Controle (DC), à base de milho e farelo de soja; (2) DC suplementada com *Bacillus subtilis* (PRO); (3) DC suplementada com *Bacillus subtilis* e óleos essenciais (PRO+OE); (4) DC suplementada com óleos essenciais (OE); e (5) DC suplementada com o antibiótico Avilamicina (ANTI).

As aves foram criadas em duas fases, inicial (1 a 21 dias) e crescimento (22 a 42 dias), com rações formuladas para atender às exigências nutricionais de cada fase, de acordo com Rostagno *et al.* (2011) (Tabela 1). O alojamento foi em galpão experimental com boxes de 3,75 m², forrados com cama de maravalha, em condição termoneutra e sob um programa de luz contínuo de 24 horas.

Aos 7, 21 e 42 dias de idade, uma ave por parcela (seis por tratamento) foi submetida a jejum alimentar de oito horas e, em seguida, abatida por deslocamento cervical.

Tabela 1 - Formulação das rações experimentais

Ingredientes (%)	Inicial 1 a 21 dias	Crescimento 22 a 42 dias
Milho	55,451	61,297
Farelo de soja 45%	37,216	30,809
Óleo de soja	3,202	4,375
Fosfato bicalcico	1,669	1,235
Calcário calcítico	0,934	0,844
Sal comum	0,490	0,452
DL - Metionina	0,325	0,279

L – Lisina - HCl	0,243	0,240
Suplemento Mineral e Vitamínico ⁽¹⁾	0,400	0,400
Antioxidante	0,010	0,010
Avilamicina ⁽²⁾
Óleos essenciais ⁽³⁾
<i>Bacillus subtilis</i> ⁽⁴⁾
Caolim (inerte)	0,060	0,060
Total	100,000	100,000
Valores calculados		
Energia metabolizável (kcal/kg)	3,020	3,174
Proteína bruta, (%)	21,600	19,133
Lisina digestível, (%)	1,253	1,097
Metionina digestível, (%)	0,609	0,536
Metionina + Cistina digestível, (%)	0,902	0,801
Triptofano digestível, (%)	0,244	0,209
Cálcio, (%)	0,867	0,713
Fósforo disponível, (%)	0,424	0,333
Sódio, (%)	0,213	0,198

Fonte: ALARCÓN (2015), adaptado pelos autores.

Notas: ⁽¹⁾Frangos/FOCUS premix mineral e vitamínico fornecido pela Agrocerec Multimix. Níveis de garantia do produto (por kg de premix): Vitamina A 2.000.000,00 UI; vitamina D3 600.000,00 UI; vitamina E 3.000,00 UI; vitamina K3 500,00mg; vitamina B1 600,00 mg; vitamina B2 1.500,00 mg; vitamina B6 1.000,00 mg; vitamina B12 3.500,00 mcg; Niacina 10,00 g; ácido pantotênico 3.750,00 mg; ácido fólico 250,00 mg; colina 86,60 g; ferro 12,50 g; manganês 17,50 g; zinco 12,50g; cobre 25,00 g; iodo 300,00 mg; selênio 50,00 mg.

⁽²⁾Surmax-200® fornecido pela Eli Lilly. A adição de Surmax-200 em substituição ao caulim (inerte) proporcionou 0,01 g de atividade de avilamicina por kg da dieta.

⁽³⁾Activo® foi fornecido pela GRASP. Activo foi padicionado em substituição ao caulim (inerte) na proporção de 0,125 g por kg da dieta.

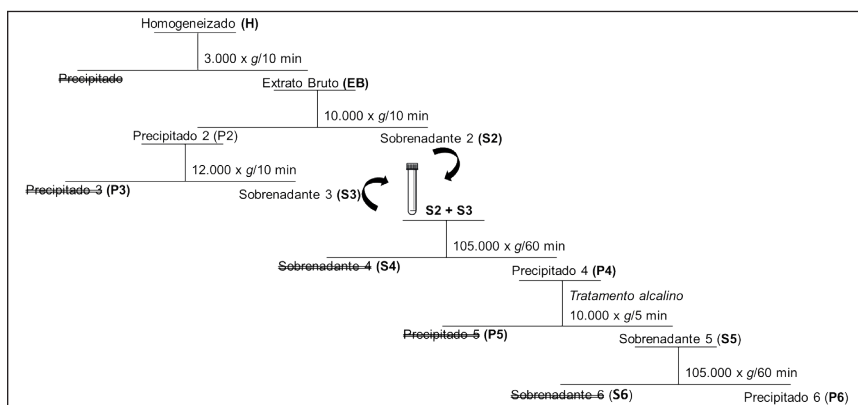
⁽⁴⁾Biotop® foi fornecido pela FATEC. A adição de Biotop em substituição ao caulim (inerte) proporcionou 5,0x10⁸ UFC por kg da dieta.

Obtenção do Extrato Enzimático

Para a obtenção dos extratos, um segmento de 20 cm do jejuno (porção entre a alça duodenal e o divertículo de Meckel) foi coletado. O tecido foi aberto longitudinalmente, lavado com solução salina a 4°C, e a mucosa foi raspada com uma lâmina metálica. O material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C.

O processamento iniciou-se com a homogeneização do tecido em um homogeneizador tipo Turrax, utilizando tampão TRIS.HCl (pH 7,3) na proporção de 1g de tecido para 10 mL de tampão. Posteriormente, as amostras foram submetidas a um protocolo de centrifugação diferencial (Figura 1), modificado de Rueda *et al.* (2007), para isolar a fração de membrana da borda em escova, onde a fosfatase alcalina intestinal está localizada. As ressuspensões dos *pellets* foram realizadas com um homogeneizador tipo Potter. O *pellet* final (P6), contendo o extrato enzimático, foi ressuspendido em tampão 0,2 M TRIS.HCl pH 7,5 com $MgCl_2$ 10 mM e $CaCl_2$ 1 mM.

Figura 1 - Modificação do esquema do método de obtenção da fosfatase alcalina ligada à membrana 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 *Potter*TM) 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: Próprio autor

Padronização das Condições de Ensaio da Atividade Enzimática

Para garantir a precisão das análises, foram padronizadas as condições ótimas de ensaio para a fosfatase alcalina intestinal, utilizando dois substratos distintos: o substrato artificial *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) e o substrato biológico Lipopolissacarídeo (LPS).

Para ambos os substratos, foram determinados os parâmetros ideais de pH, concentração de substrato e tempo de reação. Para a atividade *p*-nitrofenilfosfatásica (*p*NPPásica), avaliou-se também o efeito da temperatura (30 a 50°C) e a termoestabilidade da enzima (40 a 60°C). O pH ótimo foi determinado testando-se os tampões TRIS.HCl (pH 7-8,5), AMPOL (pH 8,5-11) e Glicina (pH 11-12). A concentração de *p*NPP variou de 0,1 a 10 mM.

Para a atividade LPS-defosforilase, o pH ótimo foi avaliado com os tampões TRIS.HCl (pH 6,5-8,5) e AMPOL (pH 8,5-10,5). A concentração do substrato LPS (extraído de *Escherichia coli*) variou de 0,125 a 2,50 mg/mL.

Determinação da Atividade Enzimática e Dosagem de Proteína

A atividade *p*NPPásica foi determinada a 37°C em tampão AMPOL 100 mM (pH 11), medindo a formação do íon *p*-nitrofenolato a 410 nm após a hidrólise de 1 mM de *p*NPP. A reação foi interrompida com NaOH 1 M. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de *p*-nitrofenolato por minuto por miligrama de proteína.

A atividade LPS-defosforilase foi determinada a 37°C em tampão AMPOL 105 mM (pH 9), quantificando o fosfato inorgânico liberado da hidrólise de 1,5 mg/mL de LPS. A reação foi interrompida com TCA 50% e o fosfato dosado pelo método descrito por Pizauro, Ciancaglini e Leone (1995). Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de fosfato por minuto por miligrama de proteína.

A concentração total de proteína nos extratos foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando um kit comercial e soroalbumina bovina como padrão.

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software Assistat 7.7 beta (Silva; Azevedo, 2016). A normalidade dos erros foi verificada pelo teste de Cramér-Von Mises. Quando a interação entre os fatores (tratamento e idade) foi significativa, realizou-se o desdobramento, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Padronização das Condições Ótimas de Ensaio

A caracterização da fosfatase alcalina intestinal revelou parâmetros cinéticos distintos para os substratos *p*NPP e LPS. Para o *p*NPP, o estudo do pH demonstrou um comportamento com dois picos de atividade, sendo o pH ótimo aparente de 11,0 em tampão AMPOL, valor alinhado com outros estudos que, embora variem entre tecidos e espécies, geralmente encontram pHs ótimos alcalinos (Cyboron; Wuthi, 1981; Chang; Moog, 1972; Santana *et al.*, 2012), como 10,3 em cartilagem de frangos e 10,45 no duodeno. A enzima apresentou um comportamento “Michaeliano” (Nelson; Cox, 2014) para a hidrólise do *p*NPP, com K_m de $1,727 \mu M$ e coeficiente de Hill próximo a 1, indicando ausência de cooperatividade alostérica.

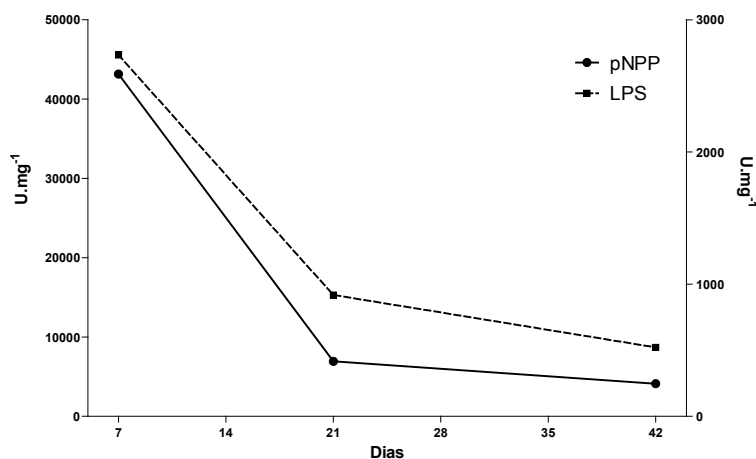
Para o substrato biológico LPS, o pH ótimo aparente foi de 9,0, também em tampão AMPOL, resultado semelhante ao encontrado em outros estudos com este substrato (Santana, 2015). Diferentemente do *p*NPP, a cinética de hidrólise do LPS sugeriu um comportamento sigmoidal, com um coeficiente de Hill de 1,576 (Nelson; Cox, 2014), indicando interações sítio-sítio e características de uma enzima alostérica. O K_m para o LPS foi de $0,736 \text{ mg/mL}^{25}$.

A enzima demonstrou ser estável a 37°C por pelo menos 25 minutos, temperatura corporal fisiológica das aves, sendo esta escolhida para os ensaios. Notavelmente, a fosfatase alcalina intestinal exibiu alta termoestabilidade, não apresentando inativação significativa mesmo após ser incubada a 60°C por uma hora, o que é similar a resultados encontrados por outros autores (Janska; Kubicz; Szalewics, 1989; Goseki; Oida; Sasaki, 1990; Sharma; Pal; Prasad, 2014). Esta característica é crucial, pois garante que a atividade enzimática não seja afetada por variações na temperatura corporal das aves, como as que ocorrem em situações de estresse térmico (Macari; Furlan; Gonzales, 2002). A FAI é, de fato, considerada a isoforma mais termoestável entre as fosfatases alcalinas. Com base nessas padronizações, as condições ótimas para os ensaios subsequentes foram estabelecidas.

Efeito das Dietas e da Idade na Atividade da Fosfatase Alcalina Intestinal

A análise da atividade enzimática ao longo do tempo (7, 21 e 42 dias) nos animais do grupo controle 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 2). Este perfil temporal está diretamente relacionado à maturação do trato gastrointestinal das aves. Ao eclodirem, os pintainhos possuem um sistema digestório anatomicamente completo, mas funcionalmente imaturo (Macari; Furlan; Gonzales, 2002).

Figura 2 - Atividade específica da fosfatase alcalina intestinal para os substratos pNPP (Eixo Y esquerda) e LPS (Eixo Y direita) na mucosa de jejuno de frangos de corte alimentados com dieta controle (DC) aos 7, 21 e 42 dias.



Fonte: Próprio autor

Nos primeiros dias de vida, ocorre um aumento expressivo na produção de enzimas digestivas para dar suporte ao rápido crescimento e desenvolvimento do animal. Os altos níveis de FAI aos 7 dias refletem, portanto, a intensa atividade metabólica e absorptiva desta fase. Além disso, é neste período que a microbiota intestinal é estabelecida (Brandt; Sampaio; Miuki, 2006), e a elevada atividade LPS-defosforilase sugere um papel crucial da FAI na modulação da resposta imune inata durante o primeiro contato com a colonização bacteriana.

Quando analisado o efeito das diferentes dietas, observou-se uma interação significativa entre os tratamentos e a idade das aves para ambos os substratos (Tabela 2). Aos 7 dias, não houve diferença significativa entre os tratamentos para a atividade pNPPásica, reforçando a ideia de que, nesta fase, os processos fisiológicos de maturação sobrepõem os efeitos da dieta.

Tabela 2 - ANOVA e resultado da comparação de Médias da atividade específica da fosfatase alcalina intestinal para o substrato pNPP e LPS ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) \pm erro padrão da média (n=3) da mucosa de jejuno de frangos de corte aos 7, 21 e 42 dias.

Fatores		Atividade específica ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	
Tratamentos	Idade (dias)	pNPP ⁽¹⁾	LPS
Efeitos principais			
DC		18068,0 \pm 6568,2 ^b	1390,9 \pm 463,64
PRO		24112,4 \pm 6657,9 ^a	1760,1 \pm 586,7
OE+PRO		16180,4 \pm 3031,8 ^{ab}	1297,3 \pm 432,4
OE		19696,4 \pm 5993,6 ^{ab}	1455,9 \pm 485,3
ANTI		23715,4 \pm 4065,4 ^a	1631,6 \pm 543,8
	7	40083,5 \pm 10349,5 ^A	2444,8 \pm 631,2 ^A
	21	11333,0 \pm 2926,2 ^B	1309,4 \pm 338,1 ^B
	42	9647,1 \pm 2490,9 ^B	767,31 \pm 198,1 ^C
Análise de variância: valores de p			
Tratamento		0,0058 ^(**)	0,2151
Idade		<0,0001 ^(**)	<0,0001 ^(**)
Tratamento x idade		0,039 ^(*)	0,0373 ^(*)
CV%		4,52	29,94

Fonte: Próprio autor

Notas: (*) significativo ao nível de 5% de probabilidade;

(**) significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns = não significativo; CV = coeficiente de variação;

⁽¹⁾ dados transformados utilizando .

Tratamentos: DC = dieta controle; PRO = dieta suplementação com *Bacillus subtilis*; PRO+OE = suplementação com *Bacillus subtilis* e óleos essenciais; OE = suplementação com óleos essenciais; ANTI = suplementação com avilamicina.

Médias seguidas por letras iguais, maiúscula na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

No entanto, com o avanço da idade, os efeitos das dietas tornaram-se mais evidentes. Para a atividade LPS-defosforilase, o tratamento com o antibiótico Avilamicina (ANTI) se destacou. Enquanto nos outros tratamentos a atividade enzimática diminuiu significativamente após os 7 dias, no grupo ANTI ela se manteve elevada e sem diferença estatística entre os 7, 21 e 42 dias (Tabela 3). A Avilamicina é um antibiótico com ação predominante sobre bactérias Gram-positivas, sua administração em doses subterapêuticas pode ter modulado a microbiota intestinal, favorecendo a proliferação de bactérias Gram-negativas.

Tabela 3 - Desdobramentos dos tratamentos e idades. Médias da atividade específica da fosfatase alcalina intestinal para o substrato pNPP e LPS (U.mg^{-1}) \pm erro padrão da média ($n=3$) da mucosa do jejuno de frangos de corte aos 7, 21 e 42 dias.

Tratamentos	Idade		
	7 dias	21 dias	42 dias
Atividade pNPPfásica			
DC	43146,2 \pm 5596,2 ^A	6930,8 \pm 3363,0 ^{bB}	4127,1 \pm 3539,1 ^{bB}
PRO	50386,2 \pm 3539,1 ^A	9826,2 \pm 577,36 ^{abB}	12124,6 \pm 107,7 ^{aB}
OE+PRO	26288,9 \pm 3825,6 ^A	14892,4 \pm 1633,6 ^{aAB}	7360,0 \pm 1476,82 ^{abB}
OE	42981,7 \pm 3380,7 ^A	9329,2 \pm 2846,6 ^{abB}	6778,2 \pm 1807,5 ^{abB}
ANTI	37614,4 \pm 1007,8 ^A	15686,4 \pm 5216,40 ^{abB}	17845,3 \pm 4903,6 ^{aAB}
Atividade LPS-defosforilase			
DC	2734,4 \pm 373,5 ^{abA}	917,5 \pm 206,7 ^B	530,8 \pm 88,8 ^B
PRO	3156,14 \pm 605,31 ^{aA}	1322,7 \pm 296,5 ^B	801,6 \pm 223,8 ^B
OE+PRO	1995,4 \pm 153,9 ^{baA}	1307,4 \pm 221,35 ^{AB}	589,0 \pm 27,36 ^B
OE	2173,4 \pm 283,61 ^{abA}	1651,33 \pm 43,6 ^A	543,1 \pm 49,5 ^B
ANTI	2164,8 \pm 239,6 ^{abA}	1348,1 \pm 101,8 ^A	1382,0 \pm 313,1 ^A

Fonte: Próprio autor

Notas: Tratamentos: DC = dieta controle; PRO = dieta suplementação com *Bacillus subtilis*; PRO+OE = suplementação com *Bacillus subtilis* e óleos essenciais; OE = suplementação com óleos essenciais; ANTI = suplementação com avilamicina.

Médias seguidas por letras iguais, maiúscula na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Como resposta a uma maior carga de LPS no lúmen intestinal, o organismo das aves parece ter aumentado a expressão ou a atividade da FAI como um mecanismo de defesa, para detoxificar o excesso de endotoxina (Gueddes; Philpott, 2008; Goldberg *et al.*, 2008), prevenir a translocação bacteriana e a inflamação sistêmica. Este resultado corrobora fortemente a hipótese de que a FAI desempenha um papel fundamental na homeostase da microbiota e na proteção da barreira intestinal.

CONCLUSÕES

A atividade da fosfatase alcalina intestinal, tanto para o substrato artificial pNPP 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. A manutenção de uma alta atividade LPS-defosforilase ao longo do tempo no grupo que recebeu

avilamicina sugere que a modulação da microbiota, com um possível aumento de bactérias Gram-negativas, induziu uma resposta compensatória do hospedeiro, reforçando o papel fisiológico da fosfatase alcalina intestinal na detoxificação do LPS e na manutenção da saúde intestinal.

REFERÊNCIAS

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

AKIBA, Y.; MIZUMORI M.; GUTH, P. H.; ENGEL, E.; KAUNITZ, J. D. Duodenal brush border intestinal alkaline phosphatase activity affects bicarbonate secretion in rats. **The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 293, p. 1223-1233, 2007.

ALARCÓN, M. F. F. **Uso de probiótico e óleos essenciais na ração sobre a microbiota intestinal, atividade de enzimas digestivas e a expressão de genes relacionados aos processos de digestão e absorção de nutrientes em frangos**. 2015. Tese (Doutorado) – UNESP/FCAV, Jaboticabal, 2015.

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.

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.

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.

CHANG, L. W.; MOOG, F. Alkaline phosphatase activity in the duodenum of chickens. **Journal of Experimental Zoology**, v. 179, n. 2, p. 229-240, 1972.

CYBORON, G. W.; WUTHI, C. K. Alkaline phosphatase from chicken cartilage. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 70, n. 3, p. 447-452, 1981.

FULLER, R. Probiotic in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GEDDES, K.; PHILPOTT, D. J. A New Role for Intestinal Alkaline Phosphatase in Gut Barrier Maintenance. **Gastroenterology**, v. 135, p. 8-12, 2008.

GOLDBERG, R. F. et al. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 9, p. 3551–3556, 2008.

GOSEKI, M.; OIDA, S.; SASAKI, S. Purification and characterization of intestinal alkaline phosphatase from rat. **Journal of Biochemistry**, v. 108, n. 1, p. 11-16, 1990.

GUEDDES, M.; PHILPOTT, D. J. The role of intestinal alkaline phosphatase in gut mucosal defense. In: **Advances in Enzymology**. Wiley, 2008. p. 135-150.

JANSKA, H.; KUBICZ, M.; SZALEWICZ, A. Stability of intestinal alkaline phosphatase in poultry. **Poultry Science**, v. 68, p. 1790-1796, 1989.

LALLÈS, J. P. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 6, p. 323-332, 2010.

LALLÈS, J.P. Intestinal alkaline phosphatase: Multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. **Nutrients**. V. 68, p. 323–332, 2010.

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

NAKANO, T.; INOUE I.; ALPERS D. H.; YASUTADA, A.; SHIGEHIO, K.; RINA, S.; KAUNITZ, J. D.; SUSUMU, O.; MASUMI, A.; SEIICHIRO, T.; IWAO, K.; MAKOTO, M.; TSUGIKAZU, K. Role of lysophosphatidylcholine in brush border intestinal alkaline phosphatase release and restoration. **The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 297, n. 1, p. 207-214, 2009.

NARISAWA, S.; HUANG, L.; IWASAKI, A.; HASEGAWA, H.; ALPERS, D. H.; MILLAN, J. L. Accelerated Fat Absorption in Intestinal Alkaline Phosphatase Knockout Mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 21, p. 7525-7530, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

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, R. B. et al. Atividade da fosfatase alcalina intestinal em frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1563-1570, 2012.

SHARMA, U.; PAL, D.; PRASAD, R. K. Alkaline phosphatase: an overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 269-278, 2014.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software Assistat-statistical attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7., Reno-NV-USA**. Anais... St. Joseph: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2016.

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. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2001000100001&lng=en&nrm=iso>. access on 15 Jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2001000100001>.

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.

VIEIRA, S. L.; MORAN, E.T. Effect of egg of origin and chick post-hatch nutrition on broiler live performance and meat yields. **World's Poultry Science Journal, Wallingford**, v.55, p.126-142, 1999.