
EFEITO DE DIETAS CONTENDO PROBIÓTICOS E/OU ÓLEOS ESSENCIAIS NA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE

Luiz Flávio José dos Santos

luiz.santos167@fatec.sp.gov.br

Faculdade de Tecnologia de Ribeirão Preto – São Paulo

Gabriella Cavazzini Pavarina

g.cavazzini12@gmail.com

Secretaria da Educação do Estado de São Paulo

Miguel Frederico Fernandez Alarcon

miguelffa@hotmail.com

Laboratório Pathovet - Ribeirão Preto - São Paulo

Renato Luis Furlan

rfurlan@unesp.br

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias /

Unesp - Jaboticabal – São Paulo

João Martins Pizauro Junior

j.pizauro@unesp.br

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias /

Unesp - Jaboticabal – São Paulo

Resumo: Com o objetivo de avaliar o efeito de aditivos alimentares na atividade da Fosfatase Alcalina Intestinal (FAI), enzima de extrema importância na saúde intestinal, frangos de corte da linhagem Cobb-500 foram alimentados com dietas contendo probiótico (*Bacillus subtilis*), óleos essenciais, sua combinação ou um antibiótico (avilamicina), comparadas a uma dieta controle. Aos 42 dias, amostras de mucosa jejunal foram coletadas para extração enzimática. A atividade específica da FAI foi determinada espectrofotometricamente utilizando dois substratos: p-nitrofenilfosfato (atividade de p-NFFase) e LPS (atividade de LPS-defosforilase). Os resultados demonstraram que a suplementação com *Bacillus subtilis* (PRO) e com o antibiótico (ANTI) promoveu um aumento na atividade da p-NFFase em comparação ao grupo controle (DC) e ao grupo que recebeu a combinação de aditivos (OE+PRO). Para a atividade de LPS-defosforilase, apenas o tratamento PRO resultou em um aumento numericamente superior, embora sem diferença entre a maioria dos grupos. Conclui-se que a suplementação dietética com probiótico modula positivamente a atividade da FAI, potencializando um importante mecanismo de defesa da mucosa intestinal, o que reforça seu papel como alternativa viável aos antibióticos promotores de crescimento na avicultura.

Palavras-chave: Aditivos alimentares; Saúde intestinal; Fosfomonohidrolases; LPS-defosforilase; Avicultura.

1. Introdução

A avicultura de corte consolidou-se como uma das atividades mais dinâmicas do agronegócio mundial, sendo o Brasil um dos maiores produtores e exportadores de carne de frango (ABPA, 2017). A eficiência da produção está diretamente relacionada à nutrição, que representa até 70% do custo total. Nesse cenário, a busca por alternativas nutricionais que promovam desempenho, saúde intestinal e bem-estar animal é constante.

O uso de antibióticos como promotores de crescimento foi prática consolidada ao longo de décadas. Contudo, seu uso indiscriminado contribuiu para o desenvolvimento de resistência bacteriana, resultando em restrições e na necessidade de alternativas seguras (DIBNER; RICHARDS, 2007). Entre as estratégias emergentes, destacam-se os probióticos e os óleos

essenciais, que atuam na modulação da microbiota intestinal e na proteção contra patógenos (FULLER, 1989; TOLEDO et al., 2007).

Os probióticos exercem efeito pela exclusão competitiva, promovendo equilíbrio intestinal favorável ao hospedeiro (FULLER, 1989). Já os óleos essenciais possuem efeito antimicrobiano seletivo, sendo capazes de inibir o crescimento de bactérias e fungos patogênicos, além de estimular o desempenho produtivo (SIKKEMA, 1995 apud TOLEDO et al., 2007). A associação dessas substâncias representa alternativa promissora para manter a saúde intestinal e reduzir o uso de antibióticos.

O trato gastrointestinal das aves, especialmente o intestino delgado, é centro de intensa atividade digestiva, absorptiva e imunológica. Sua colonização por microrganismos ocorre logo após a eclosão e influencia profundamente a saúde e o metabolismo do animal (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006). A manutenção da homeostase intestinal depende de uma interação equilibrada entre microbiota, fatores nutricionais e mecanismos endógenos de defesa (ABBOTT, 2004; GEEDES; PHILPOTT, 2008).

Entre esses mecanismos, destaca-se a Fosfatase Alcalina Intestinal (FAI), enzima presente na borda em escova dos enterócitos, que exerce funções digestivas e imunomoduladoras. Sua principal ação está na detoxificação do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, reduzindo seu potencial inflamatório (GEDDES; PHILPOTT, 2008; BATES et al., 2007). Além disso, estudos mostram que a FAI preserva a integridade da barreira intestinal, regula a microbiota e previne a translocação bacteriana (GOLDBERG et al., 2008). Assim, compreender a interação entre aditivos nutricionais (probióticos e óleos essenciais) e a atividade da FAI é fundamental para avaliar seu potencial no desempenho zootécnico e na saúde intestinal de frangos de corte.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade de p-NFFase e LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal de frangos de corte Cobb-500 alimentados com diferentes dietas contendo probióticos e/ou óleos essenciais.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material biológico

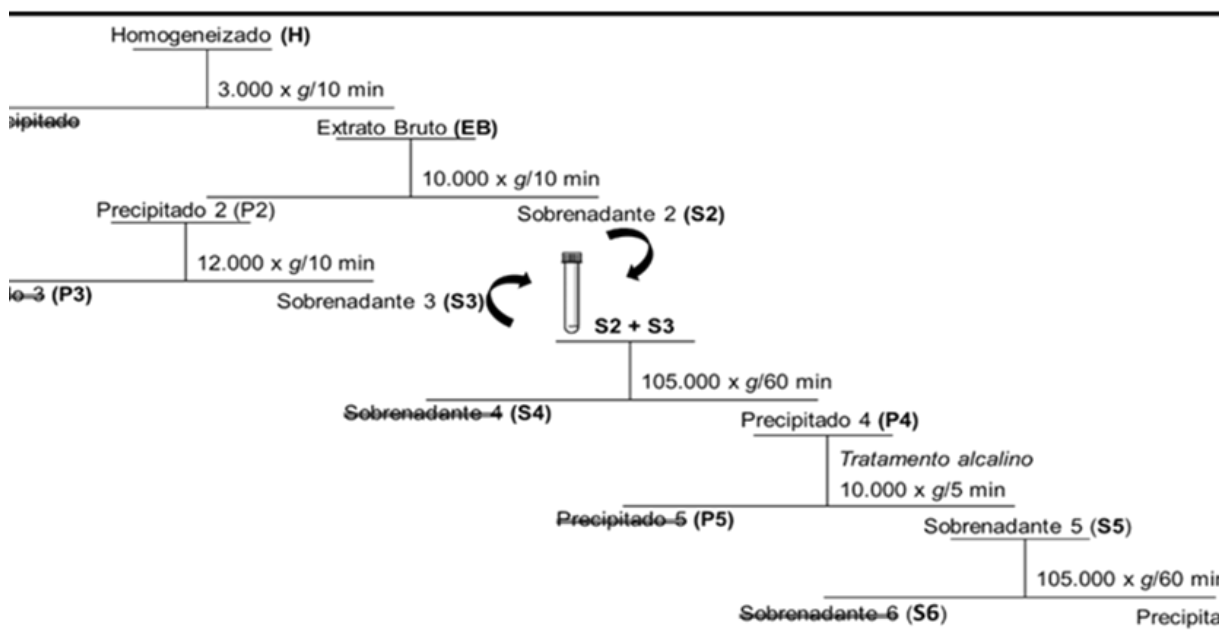
Os animais utilizados neste trabalho, bem como os protocolos de manipulação e sacrifício, foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais da FCAV, estando, portanto, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Foram utilizados de corte machos da linhagem Cobb-500 obtidos de um incubatório comercial, sendo que a ração em cada fase foi formulada a base de milho e farelo de soja para atender as exigências nutricionais das aves, de acordo com Rostagno et. al (2011). As aves foram criadas em condição termoneutra, sob um programa de luz contínuo de 24 horas, em um galpão experimental constituído de boxes de 2,50 m de comprimento por 1,50 m de largura, totalizando 3,75 m², forradas com cama de maravalha com aproximadamente 10 cm de altura.

2.2 Obtenção do extrato enzimático

Aos 42 dias seis aves foram abatidas por deslocamento cervical, após jejum alimentar de oito horas, para as análises. Os extratos enzimáticos foram obtidos a partir de 20 centímetros de jejuno (correspondendo à porção do intestino delgado posterior à alça duodenal e anterior ao divertículo de Meckel), que foram abertos longitudinalmente, grampeados pelas extremidades sobre papelão e a mucosa foi lavada com solução salina 9% a 4°C, raspada com auxílio

de lâmina metálica esterilizada e o material foi armazenado em tubo de criopreservação, congelado em nitrogênio líquido e conservado em freezer a -70°C . O processamento foi realizado em homogeneizador tipo Turrax (marca OMNI, modelo GLH-2511) em tampão TRIS.HCl (pH 7,3) contendo 1 mM de CaCl_2 , 10 mM de MgCl_2 e 0,25 M de Sacarose na proporção de 1 grama de tecido para 10 ml de tampão. As amostras homogeneizadas seguiram o esquema de centrifugação diferencial modificado de Rueda e Colaboradores (2007), como esquematizado na Figura 1. As ressuspensões foram realizadas com o auxílio de um homogeneizador tipo PotterTM a 300 rev./min.

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 e colaboradores (2007).¹



Fonte: Próprio autor

2.3 Determinação da atividade p-NPPásica da fosfatase alcalina intestinal

A atividade p-NPPásica da enzima fosfatase alcalina intestinal foi determinada descontinuamente, a 37°C , em tampão AMPOL 100 mM, pH 11, através da formação do íon p-nitrofenolato ($\epsilon = 17600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pH 13), a 410 nm a partir da hidrólise do p-NFF (SIGMA[®]) 1 mM. 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. Após mistura por agitação, a absorbância foi determinada a 410 nm. As determinações foram efetuadas em triplicatas e as velocidades iniciais permaneceram constantes durante o tempo de incubação, assegurando-se uma hidrólise de substrato sempre inferior a 5%. Em cada determinação foi incluído um

¹ 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, 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 ressuspensionado em tampão 0,2 M TRIS.HCl pH 7,5 com MgCl_2 10 mM e CaCl_2 1 mM.

controle para estimar a hidrólise não enzimática do substrato. 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 Determinação da atividade LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal

A atividade de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal foi determinada descontinuamente, a 37°C , através da dosagem do fosfato inorgânico liberado pela hidrólise do substrato, LPS diluído em água destilada na concentração final de $1,5 \text{ mg/ml}$, em tampão AMPOL 105 mM , $\text{pH } 9$, contendo MgCl_2 1 mM , ZnCl_2 $10 \mu\text{M}$.

A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio de reação e interrompida pela adição de $0,1 \text{ mL}$ de solução gelada de TCA 50% (p/v). Este meio reacional foi centrifugado por 2 minutos a 10.000 g . A dosagem do fósforo inorgânico presente no meio de reação foi realizada de acordo com o método descrito por Pizauro, Ciancaglini e Leone (1995). Neste método, o fosfato inorgânico liberado no meio reacional é complexado pelo molibdato de amônio acidificado com ácido sulfúrico. O fosfomolibdato formado é imediatamente extraído com acetona, sob agitação contínua durante 15 segundos. O excesso de molibdato presente no meio reacional é complexado pelo citrato e, em seguida, o fosfomolibdato formado é dosado espectrofotometricamente a 355 nm .

As determinações foram efetuadas em triplicatas e as velocidades iniciais permaneceram constantes durante o tempo de incubação, assegurando-se hidrólise de substrato sempre inferior a 5% . Em cada experimento foram incluídos controles sem a reação enzimática para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um nmol de fosfato por minuto por miligrama de proteína presente no extrato, nas condições de ensaio.

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

A análise da atividade da Fosfatase Alcalina Intestinal (FAI) frente aos substratos p-NFF e LPS revelou diferenças significativas entre os alguns grupos experimentais (Tabela 1). As dietas suplementadas com probióticos e/ou óleos essenciais apresentaram maior atividade enzimática em comparação à dieta controle. Esse aumento pode estar relacionado ao efeito modulador desses aditivos sobre a microbiota intestinal, favorecendo ambiente mais estável e menor estímulo inflamatório (FULLER, 1989).

Tabela 1 - ANOVA e resultado da comparação de Médias da atividade específica da fosfatase alcalina intestinal para o substrato p-NFF e LPS (U.mg-1) ± erro padrão da média (n=3) da mucosa de jejuno de frangos de corte.²

Fatores	Atividade específica (µmol/mg/min)	
	p-NFF(1)	LPS
Tratamentos		
DC	18068,0±6568,2b	1390,9±463,64 ab
PRO	24112,4±6657,9a	1760,1±586,7 a
OE+PRO	16180,4±3031,8b	1297,3±432,4 ab
OE	19696,4±5993,6ab	1455,9±485,3 ab
ANTI	23715,4±4065,4a	1631,6±543,8 ab
Tratamento	0,0058(*)	0,2151(*)
CV%	4,52	29,94

Fonte: Próprio autor

Apesar da falta de efeito estatístico, a atividade de LPS-defosforilase foi particularmente elevada nas aves que receberam dietas com probióticos, indicando maior capacidade de detoxificação do LPS bacteriano. Esse resultado está em consonância com estudos que apontam a FAI como mecanismo essencial de defesa da mucosa, prevenindo inflamação exacerbada e contribuindo para a homeostase intestinal (BATES et al., 2007).

Nos grupos suplementados com óleos essenciais, observou-se aumento da atividade enzimática em relação ao controle. esse padrão pode estar relacionado ao efeito antimicrobiano seletivo dos óleos, que reduz a colonização de bactérias patogênicas e consequentemente diminui a carga de LPS no lúmen intestinal (SIKKEMA, 1995 apud TOLEDO et al., 2007).

A associação de probióticos e óleos essenciais resultou em sinergismo, refletido em maior atividade da FAI ao longo do experimento. Esse achado é coerente com a literatura, que sugere que a combinação de aditivos pode potencializar a saúde intestinal e a eficiência digestiva (LOUDDI et al., 2000; NUNES, 2008).

Do ponto de vista fisiológico, a maior atividade da FAI em aves suplementadas está diretamente associada à manutenção da barreira intestinal, regulação da microbiota e prevenção de distúrbios metabólicos (GOLDBERG et al., 2008). Além disso, a especificidade da enzima para substratos fosforilados, já descrita em estudos clássicos (BATES et al., 2007), reforça a importância da análise da atividade frente a diferentes compostos, como o p-NPP e o LPS.

De forma geral, os resultados demonstram que dietas contendo probióticos e/ou óleos essenciais modulam positivamente a atividade da FAI em frangos de corte. Esses efeitos sugerem não apenas benefícios para o desempenho zootécnico, mas também implicações relevantes para a saúde intestinal e para a redução da necessidade de antimicrobianos na avicultura.

Em contraste, os resultados para o substrato LPS mostram de modo geral, as intervenções dietéticas não alteraram de forma conclusiva a atividade da enzima para este substrato em específico. Apenas a suplementação com *Bacillus subtilis* sozinho (PRO) promoveu uma atividade significativamente maior, enquanto todos os outros tratamentos, incluindo o antibiótico e as combinações, não diferiram estatisticamente entre si ou da dieta controle.

2 Notas: (*) significativo ao nível de 1% de probabilidade; (1) dados transformados utilizando ; CV = coeficiente de variação; Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p>0,05). 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.

4. Considerações Finais

Conclui-se que dietas suplementadas com probióticos e/ou óleos essenciais aumentam a atividade da Fosfatase Alcalina Intestinal em frangos de corte, especialmente no que se refere à detoxificação de LPS. Esses achados reforçam a relevância desses aditivos como alternativas ao uso de antibióticos promotores de crescimento, contribuindo para a saúde intestinal, o bem-estar animal e a sustentabilidade da produção avícola.

5. Referências

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL - ABPA. História da avicultura no Brasil. 2017. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil>. Acesso em: 02 fevereiro 2018.

BATES, J. M., AKERLUND, K., MITTGE, E. GUILLEMIN, K. 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.

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.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D.; KITCHELL, M. L.; QUIROZ, M. A. Metabolic challenges and early bone development. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 16, n. 1, p. 126-137, 2007.

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.

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

LOUDDI, M. M.; GONZALES, E.; TAKITA, T. S.; MENDES, A. A.; ROÇA, R. O. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 4, p. 1124-1131, 2000.

NUNES, A. D. Influência do uso de aditivos alternativos a antimicrobianos sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte. 2008. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10135/tde-19032008-134523/>>. Acesso em: 2014-11-01.

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.

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.