



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020022049-7 A2



(22) Data do Depósito: 28/10/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 10/05/2022

(54) **Título:** PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE COMPOSIÇÕES DE NUTRIÇÃO ANIMAL, PRODUTO OBTIDO E USO DO MESMO

(51) **Int. Cl.:** A23K 20/184; A23K 50/80.

(52) **CPC:** A23K 20/184; A23K 50/80.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** THIAGO DIAS TROMBETA; GUILHERME WOLFF BUENO.

(57) **Resumo:** PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE COMPOSIÇÕES DE NUTRIÇÃO ANIMAL, PRODUTO OBTIDO E USO DO MESMO. A presente invenção se insere no campo da biotecnologia e nutrição animal, aplicando processos biotecnológicos para produção de rações balanceadas específicas que permitem a melhoria na qualidade de carne de devido a utilização de composições de nutrição animal, contendo aditivo alimentar com níveis de inclusão de 20 a 40 ppm de cloridrato de ractopamina em sua composição sob consumo contínuo por 40 dias na produção de peixes tropicais. A aplicação de processos biotecnológicos para obtenção de novos produtos e produção animal que permite a melhoria na qualidade de carne na criação de peixes é uma nova alternativa viável de produto e processo para empreendimentos aquícolas, além de agregar valor para organizações e empresas que visam aplicar processos inovadores e seguros de produção, gerando produtos/ pescados mais saudáveis que atendem à mercados diferenciados. Mais particularmente, a presente invenção refere-se ao processo de obtenção de composições de nutrição animal, produto obtido e seu uso como ração em aquicultura.



**Processo de fabricação de composições de nutrição
animal, produto obtido e uso do mesmo**

Campo da invenção:

[001] A presente invenção, compreendida no campo de aplicação de nutrição animal, apresenta composições de nutrição animal obtidas por meio de processos que possibilitam a aquisição de carne de pescado magra "light" por meio da inclusão do aditivo alimentar cloridrato de ractopamina em concentrações específicas na dieta para peixes tropicais.

[002] O processo compreende em uma nova fórmula de ração balanceada para peixes que possibilita a diminuição de gordura na carne do pescado e melhoria da qualidade nutricional do alimento com inclusão de até 40 ppm do cloridrato de ractopamina em sua composição.

Fundamentos da invenção:

[003] Refere-se o presente relatório descritivo de patente de invenção de processo para produção de ração balanceada e extrusada para peixes a partir da utilização de um percentual do aditivo nutricional cloridrato de ractopamina para inclusão em rações para peixes. Processo que poderá ser empregada por produtores de pescado e pela indústria aquícola.

[004] Dos inúmeros aditivos usados na dieta animal, existem 13 grupos diferentes que podem ser classificados em três grandes classes de acordo com sua função, sendo elas: pró-nutrientes, auxiliares de processamento e profiláticos (Rosen, 1996; Compêdio, 1998). Na classe dos pró-nutrientes podemos encontrar aqueles em que algum ingrediente pode favorecer o desenvolvimento e desempenho produtivo dos

animais; no caso dos auxiliares de processamento, são utilizados no processo de preparo da dieta alimentar e, entre outros, atuam sobre as características físicas dos alimentos, como cor, cheiro, etc; finalmente, os aditivos profiláticos são aqueles usados para a prevenção de desequilíbrios oxidativos ou prevenção de doenças (Rosen, 1996).

[005] Em geral, pode-se dizer que todos os aditivos compartilham um objetivo, que é melhorar a eficiência da produção, não sendo exceção os promotores de crescimento. Nesse grupo de aditivos que pertence à classe dos pró-nutrientes, encontram-se os agentes beta-adrenérgicos e hormônios como a somatotropina, cujo uso já está estabelecido em alguns animais mamíferos, mas que carecem de estudos que permitir uma avaliação correta do seu uso na aquicultura (Mente, 2011; Amlund, 2012). Dentro deste subgrupo de agentes beta-adrenérgicos, estão as fenetanolaminas que fazem parte de uma classe de compostos que foram usados na medicina humana, como medicamentos para o tratamento de asma, taquicardia e doenças pulmonares (Hoffman e Lefkowitz , 1990), cujo efeito está associado à sua capacidade de se ligar a receptores β -adrenérgicos.

[006] Na produção animal, o uso desses compostos tem sido estudado trabalhando com mamíferos, como porcos, bovinos e ovinos, espécies em que têm demonstrado efeitos positivos nas características da carcaça, além de reduzir o teor de gordura e gerar aumento no lucro de carne magra (Moody et al., 2000; Almeida, et al., 2012). As informações disponíveis em mamíferos indicam que o uso de fenetanolaminas em animais está associado ao seu efeito no

sistema adrenal, atuando como modificadores do metabolismo, modificando as taxas de produção, através da alteração nas taxas de síntese protéica e modificação do conteúdo de gordura no corpo do animal (Lawrence & Coppack, 2000; Mills, 2002).

[007] Na aquicultura, o crescimento eficiente dos peixes é um dos elementos que mais influenciam o desenvolvimento sustentável desta indústria. Por ser uma das principais espécies cultivadas no mundo, a tilápia, tem uma conversão alimentar média de 1,5 kg (Scorvo Filho et al., 2010), ou seja, mais alimentos são utilizados (peixes e farelo de soja, milho, óleos e etc), para produzir uma quantidade menor de alimentos que, entre outras coisas, se traduz no uso ineficiente de recursos agrícolas e pesqueiros (Boscolo, et al., 2001; Yakubu, et al., 2013). Com base nas evidências sobre o uso da ractopamina, sugere-se que o composto possui características favoráveis para seu uso na aquicultura. Além disto, a busca por alimentos mais saudáveis, com baixo teor de gordura e elevada qualidade nutricional é uma demanda do mercado consumidor e desafio para a indústria aquícola. Assim, esta invenção propõe uma formulação de ração específica e inédita utilizando o cloridrato de ractopamina para aumentar os ganhos de carne magra, melhorar o crescimento dos peixes, melhorando a qualidade dos filés para o consumidor. Tendo a espécie *Oreochromis niloticus* como unidade modelo/protótipo de aplicação.

Estado da técnica:

[008] Os principais aditivos pró-nutrientes da classe das fenetanolaminas estudados em animais são: Cimaterol,

Clenbuterol, L-644, 969, Ractopamina, Salbutamol e Zilpaterol (Moody et al., 2000). O objetivo da utilização desses compostos na produção animal tem sido melhorar os parâmetros de produção como ganho de peso, melhor eficiência alimentar (conversão alimentar), aumento da carne magra e maior rendimento de carcaça (Moody et al., 2000). Na aquicultura, existem poucos estudos que relatam o uso dietético de fenetanolaminas e seu efeito na resposta produtiva e metabólica dos peixes. O grau de resposta obtido com o uso de fenetanolaminas pode variar dependendo da espécie animal, entre outros fatores, devido à especificidade, tipos e abundância de receptores adrenérgicos e suas vias de sinalização associadas (Mersmann, 1998). Em suínos, a ractopamina tem sido amplamente utilizada e relatado que pode redirecionar o metabolismo dos animais, promovendo deposição de proteínas e diminuindo o acúmulo de lipídios, contribuindo assim para o crescimento mais magro dos animais proporcionando melhor rendimento de carcaça e uma indústria mais ambientalmente sustentável (Moody et al., 2000; Schinckel et al., 2003).

[009] Além das espécies para as quais a dieta é alimentada com ractopamina, outros fatores que influenciam no efeito que pode ser alcançado com o uso desse tipo de composto podem ser citados na formulação da dieta, tempo de tratamento, dose, idade, peso e genética dos animais, todos fatores que parecem determinar a resposta à inclusão de fenetanolaminas (Mersmann, 1995; Moody et al., 2000; Johson, et al., 2014).

[010] Em relação à formulação da dieta, verificou-se que para que a inclusão de fenetanolaminas seja eficaz, são

necessários níveis mais elevados de proteína e energia na dieta em comparação com os animais controle (Schinckel et al., 2003). O que se justifica devido ao aumento da síntese protéica e gasto energético dos animais devido ao metabolismo acelerado (Mersmann, 1998). Em termos de tempo de uso no animal e da dose em que é usado para alimentação, os efeitos das fenetanolaminas variam se esses fatores mudarem. (Rossi, 2010). Uma forma de explicar essa variação está relacionada ao desenvolvimento de um fenômeno conhecido como dessensibilização ou sequestro de receptores β -adrenérgicos que também acaba participando da modulação de sua ação (Mills, 2002). As evidências disponíveis também indicam que, em geral, as fenetanolaminas parecem ser mais eficazes em animais mais pesados e mais velhos, uma vez que, por exemplo, as fenetanolaminas não apresentam bons resultados em suínos e bovinos jovens, sem alterações no desempenho. canal e diminuição no conteúdo de gordura. Isso pode ocorrer devido à composição corporal dos animais, pois em animais mais velhos dessas espécies o percentual de gordura aumenta linearmente (Mersmann, 1995; Mitchell, 2008). Em relação ao fator genético, as fenetanolaminas parecem ser mais eficientes em animais geneticamente selecionados com potencial de crescimento superior, como, por exemplo, em linhagens específicas de suínos e ovinos que passaram por melhoramento genético para atingir melhores taxas de crescimento produtivo. e desempenho do canal (Moody, et al., 2000). Os efeitos relatados ocorrem quando as fenetanolaminas se ligam a receptores beta adrenérgicos que são ativados, gerando diferentes respostas fisiológicas.

[011] O modo de ação da ractopamina: as ações fisiológicas das fenetanolaminas são mediadas quando os agonistas adrenérgicos se ligam aos receptores β -adrenérgicos (Mersmann, 1998). É na membrana celular, especificamente na região transmembranar, onde os receptores β estão localizados em um estado de repouso / desativado e acoplados à proteína Gs. Naturalmente, os receptores β são ativados por catecolaminas (epinefrina e noradrenalina), e quando substâncias agonistas como a ractopamina são utilizadas, ocorrem as mesmas transduções de sinal, que começam com a ligação da molécula de ractopamina com o receptor β , ativando-o, (para atuar como o primeiro mensageiro), que por sua vez estimula a atividade da enzima adenilato ciclase, convertendo ATP (adenosina trifosfato) em cAMP (adenosina monofosfato cíclico) (Mersmann, 1998; Cicogna et al., 1999 em Moody)

Breve descrição da invenção:

[012] Trata-se de uma composição de nutrição animal, produzida por processos que possibilitam a aquisição de carne magra "light" de pescado por meio da inclusão do aditivo alimentar em concentrações específicas na dieta para peixes tropicais.

[013] A nova fórmula de ração balanceada extrusada para peixes tropicais possibilita a diminuição de gordura na carne do pescado e auxilia na qualidade nutricional do alimento com inclusão de até 40 ppm do cloridrato de ractopamina em sua composição.

Breve descrição das figuras

[014] Para obter uma total e completa visualização do objeto

desta invenção, são apresentadas as tabelas e figuras as quais se faz referências, conforme se segue:

Tabela 1. apresenta os requerimentos nutricionais para a espécie alvo do teste (tilápia do Nilo: *Oreochromis niloticus*) para fase de engorda.

Tabela 2. Apresenta as condições técnicas empregadas para elaboração dos processos de produção da ração extrusadas em condições específicas para esta nova fórmula desenvolvida.

Tabela 03. Composição e análise dos ingredientes que compõe as rações testadas com o aditivo C. ractopamina.

Figura 01. Descrição das etapas de fabricação das dietas contendo o aditivo C. ractopamina.

Figura 02. Demonstra a infraestrutura de testes e validação do protótipo da ração balanceada com nível de maturidade tecnológica TRL=6.

Figuras 3. Processamento e análise dos filés de pescado e imagens das fibras musculares dos peixes indicando a diminuição de deposição de gordura e a obtenção do filé magro "light".

Tabela 4. Demonstra o desempenho zootécnico e eficiência da produção de tilápia em sistema de recirculação que consumiram a nova formulação das rações contendo níveis de 10, 20 e 40 ppm de cloridrato de ractopamina.

Tabela 5. Efeitos das doses e dias de tratamento do cloridrato de ractopamina sobre as variáveis químico-bromatológicas dos filés de tilápia.

Tabela 6. Efeitos das doses e dias de tratamento do cloridrato de ractopamina sobre a composição de ácidos graxos nos filés de tilápias.

Tabela 7. Efeitos das doses e dias de tratamento do cloridrato de ractopamina sobre as classes de fibras musculares.

Descrição detalhada da invenção:**Preparação da formulação da ração com cloridrato de ractopamina.**

[015] A elaboração de uma nova fórmula de ração balanceada contendo cloridrato de ractopamina foi realizada considerando níveis crescentes do aditivo o que permitiu uma análise mais profunda no desempenho dos peixes. Os componentes principais utilizados na ração foram: farelo de soja, farelo de milho, farinha de vísceras de aves, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, arroz quiseira, premix, fosfato bicálcio, entre outros (Tabela 1). As quatro dietas experimentais foram formuladas utilizando os requisitos para nutrição de tilápia (NRC, 2011), com uma dieta controle e três com as doses RAC (Ractosuín®, Ouro Fino Animal Health, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) 10, 20 e 40 ppm, com 4 repetições cada (Tabela 1). Cada dieta foi suplementada com uma quantidade igual de vitaminas e minerais. Os ingredientes foram misturados e umedecidos com 40% de água e posteriormente transformados em pellets em extrusora profissional na Universidade Federal de Viçosa (INBRA LABOR PQ-30, INBRAMAQ, Brasil) e formaram pellets com aproximadamente 4 mm de comprimento. Esses pellets foram secos e armazenados em freezer (5 ° C) até o uso.

Avaliação de desempenho zootécnico dos peixes

[016] Após a elaboração das rações, realizou-se um experimento para avaliação de desempenho zootécnico dos

peixes. Essa etapa foi realizada Centro de Tecnologia em Piscicultura da Secretaria de Agricultura do Distrito Federal, em Brasília, Brasil. O estudo foi realizado em sistema de recirculação fechado (Figura 1 e 2), contendo filtros mecânicos e biológicos com volume de 14,8 m³ e capacidade máxima de filtragem de 20 L/min. Sete Tilápias (*Oreochromis Niloticus*) (peso médio inicial 519,37 ± 114,3g) foram distribuídas aleatoriamente em cada uma das 16 lagoas circulares de 500L (450L úteis), instaladas em ambiente coberto e fechado, totalizando 112 peixes no estudo. Foi considerado um período pré-experimental de 20 dias para a aclimação dos peixes aos tanques. Durante este período, os peixes foram alimentados até a saciedade duas vezes ao dia durante 10 dias com pellets comerciais (32% de proteína bruta, 5% de lipídios e 3.000 kcal / kg de energia), o mesmo alimento que comiam na piscicultura e nos outros 10 dias, os peixes foram alimentados com o pellet basal da dieta controle. Após a aclimação, os peixes foram divididos em 4 tratamentos (0, 10, 20 e 40 ppm de ractopamina), com 4 repetições (Figura 2). Os peixes foram individualizados por meio de etiquetas PIT (Figuras 1 e 2). A oxigenação do sistema foi feita por meio de mangueiras de silicone de 4 mm de diâmetro e com uma pedra porosa em uma das extremidades, conectada a um tubo de PVC alimentado por um compressor de canal de 0,75CV (Figura 2). O controle da temperatura foi

realizado por 16 termostatos de 500w instalados individualmente no interior de cada lagoa. Os peixes foram mantidos em condições de fotoperíodo natural (12 horas de luz / 12 horas de escuridão). Os seguintes parâmetros foram calculados:

- ganho de biomassa: $[\text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}]$.
- taxa de sobrevivência: $(\text{número total de peixes} - \text{número de peixes mortos}) \times 100 / (\text{número total de peixes})$.
- conversão alimentar: $[\text{FCR} = \text{consumo aparente (g)} / \text{ganho de peso (g)}]$.
- taxa de crescimento específica: $[\text{SGR} = (\ln \text{peso final} - \ln \text{peso inicial} \times 100) / \text{dias de tratamento}]$.
- rendimento de carcaça: $[\text{peso do peixe (g)} - \text{peso das vísceras (g)}] \times 100 / (\text{peso do peixe})$;
- taxa de eficiência protéica: $[\text{ganho de peso (g)} / \text{proteína consumida (g)}]$;
- índice hepatossomático: $[\text{HI} = (\text{peso do fígado} / \text{peso corporal}) \times 100]$ e
- índice viserossomático: $[\text{IVS} = (\text{peso das vísceras} / \text{peso corporal}) \times 100]$.

Condições experimentais

[017] Qualidade da água: A temperatura, o oxigênio dissolvido e o pH foram monitorados duas vezes ao dia por meio de uma sonda multiparâmetros (YSI 5200, Yellow Springs, OH, EUA), durante os 40 dias de experimento, coletando dados nos 16

tanques. Para os compostos nitrogenados (amônio, nitrito e nitrato) foi medido a cada dois dias por meio do card kit amônia indot (ALFAKIT, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). A temperatura da água foi mantida entre 25,1-26,7°C, o oxigênio dissolvido entre 6,0-6,9 mg/L, o pH entre 6,5-7,7, amônio e nitrito <0,05 mg/L e nitrato <1000 mg/L, todos os valores dentro das faixas recomendadas para o cultivo de tilápia (Boyd, 1990). A vazão de água foi ajustada para uma taxa de 2,5L / min, suficiente para a retirada dos resíduos solúveis e suspensos, enquanto os resíduos sólidos foram retirados por sifonação do fundo das caixas, ação realizada uma vez por semana. Possíveis resíduos de ractopamina na água foram dissolvidos no volume total do sistema de recirculação e no sistema de filtração. Durante a operação normal do sistema, foi considerada uma reposição de água de aproximadamente 5% ao dia devido à evaporação.

[018] Alimentação: Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (8h30 e 18h00) até a saciedade que foi verificada por meio da observação visual dos pellets flutuando na água. Vinte minutos após a alimentação, verificaram-se nas caixas possíveis sobras de pellets na água ou que haviam sido totalmente consumidas e, a partir dessa observação, foi feito um ajuste da alimentação no dia seguinte. Mortalidades ou anormalidades no experimento foram monitoradas diariamente.

[019] Amostragem: No 20° e 40° dia de experimento ocorreram as coletas de dados e amostras. Todos os peixes foram anestesiados com óleo de cravo com 50 mg L⁻¹ (Inoue et al., 2003), e pesados e medidos individualmente. Durante cada pesagem, dois peixes foram selecionados aleatoriamente em cada tanque, os quais foram abatidos por corte da coluna vertebral. Em seguida, foram retiradas amostras de filé e de músculo para análise químico-bromatológica e morfometria das fibras musculares (Figuras 3), as amostras de filé foram imediatamente armazenadas em freezer a -80°C.

Análise dos filés

[020] Análises químico-bromatológicas: Foram analisados os teores de umidade, lipídios, proteínas e cinzas no laboratório de química da Universidade Federal de Lavras, onde foram determinadas de acordo com as normas da Association of Official Analytical Chemists - AOAC, com os seguintes métodos: AOAC 925.10, AOAC 920.39, AOAC 955.04 e AOAC 900.02, respectivamente (AOAC, 2000). Para a determinação de lipídios e proteínas, as amostras congeladas foram liofilizadas por 48 horas (liofilizador LIOTOP, modelo L108) e a seguir homogeneizadas, para realização imediata das análises. O teor de umidade foi determinado por análise gravimétrica através da diferença de peso das amostras antes e após o processo de liofilização (AOAC, 2000). Os lipídios foram determinados pelo método de Soxhlet (extração com éter de petróleo), onde a gordura foi extraída por 6 horas por decapagem com solvente, em seguida o solvente foi removido

por aquecimento (AOAC, 2000). A quantificação do teor de proteína bruta ($\% \text{ PB} = \% \text{ N} \times 6,25$) foi realizada pelo método Kjeldahl utilizando o autoanalisador Kjeltex 1030 (Tecator, Hoganas, Suécia) (AOAC, 2000). As cinzas foram determinadas por análise gravimétrica, onde as amostras foram incineradas na mufla a 550 ° C por 6 horas (AOAC, 2000).

[021]: Análise de ácidos graxos: Os ácidos graxos das amostras de filé foram extraídos utilizando a metodologia de Folch et al. (1957). Cinco gramas das amostras foram homogeneizadas com 50 mL de solução de clorofórmio/metanol (2:1) + butil hidroxitolueno (0,025g/L⁻¹) usando o Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) por 3 minutos, operado em velocidade média. Em seguida, as amostras foram filtradas em papel de filtro qualitativo com filtração rápida. Depois, o material do filtro foi coletado, o qual foi transferido para um funil de separação de 500 mL, onde foram adicionados 10 mL de solução de cloreto de potássio (0,72%). A solução foi então agitada, a qual permaneceu em repouso por 3 horas. Após o repouso, a solução foi dividida em duas fases com polaridades diferentes. A fase polar foi descartada e na fase apolar foram adicionados 6 mL de cloreto de potássio (0,72%), permanecendo em repouso por mais 12 horas. Novamente, a parte polar foi descartada, levando-se apenas a parte apolar, que foi colocada em um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com clorofórmio, resultando em uma solução esterificada. Para a esterificação, 5 mL da solução foram colocados em um tubo de centrifugação, em seguida o clorofórmio foi evaporado em banho-maria a 55 °C com gás nitrogênio. Em seguida, foram adicionados 4 mL de hidróxido

de sódio (0,5 M) em metanol, colocando a amostra em um banho fervente por 5 minutos e depois resfriando em água gelada. Após o resfriamento, 4 mL de cloreto de sódio e 5 mL de hexano foram adicionados à solução. A solução resultante do processo anterior permaneceu em repouso por 10 minutos e posteriormente o sobrenadante foi coletado em frasco de vidro âmbar. O hexano foi evaporado com gás nitrogênio em banho-maria a 55 °C. Os ésteres resultantes da etapa de esterificação foram submetidos à análise por cromatografia gasosa no equipamento SHIMADZU GC 2010, com detector de ionização de chama (FID), utilizando coluna capilar (100m x 0,25mm x 0,2mm) As seguintes condições de cromatografia foram utilizadas: Injetor: funcionou em modo "split", utilizando hélio como gás de arraste com vazão de 1,09 mL/min⁻¹. Foi injetado 1 µL de amostra, com tempo de execução de 60 minutos. Coluna: a temperatura inicial foi de 140°C, mantendo-se por 5 minutos e aumentando a taxa de 4°C.min⁻¹ até 240°C. A fase estacionária da coluna era composta por cianopropil polissiloxano. A identificação e quantificação dos ácidos graxos foram feitas comparando-se os tempos de retenção dos ésteres do padrão Supelco TM 37 FAME MIX, com as amostras.

Análise Morfométrica das Fibras Musculares

[022] Um fragmento de músculo branco de 1,5cm² foi retirado da região dorsal do peixe e imediatamente o tratamento foi realizado com crioprotetor (talco neutro) em solução de isopentano e preservado em nitrogênio líquido a -196°C. As amostras foram então armazenadas em tubos criogênicos e colocadas no freezer a -80°C. Seguindo o protocolo de

Bancroft e Steven, 1990, os cortes histológicos foram preparados com o equipamento criostato (Leica CM1850 UV, Alemanha). As referidas seções foram colocadas na lâmina. Em seguida, as amostras foram imersas em solução de cálcio de Baker (HCHO 37%, CaCl₂ e água destilada) por 5 minutos e lavadas em água por mais 5 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à coloração com hematoxilina de carazzi por 3 minutos com lavagens por 2 minutos, seguida de incubação com eosina acética 1% com floxina-B por 30 segundos e lavagem em água por 1 minuto (Bancroft e Steven, 1990). As amostras foram desidratadas em incubações seriadas em álcool etílico, álcool etílico com xilol e xilol, em diferentes concentrações. Ao final desse processo as lâminas foram montadas com selante (enthelan®) e lamínulas. As amostras histológicas foram fotografadas com objetiva de 10x utilizando um microscópio óptico Olympus CX31 (Olympus, Japão) acoplado a uma câmera digital Altra SC30 (Olympus, Japão) e, utilizando o programa AxioVision (Carl Zeiss, Alemanha), o diâmetro das fibras musculares de cada lâmina (Dubowitz & Brooke, 1973). Três imagens foram capturadas na mesma área de 1x1cm de todos os peixes amostrados e o diâmetro de uma média de 346 fibras musculares de cada peixe foi medido. Para avaliar as diferenças no grau de crescimento hipertrófico do tecido muscular, os dados de diâmetro foram ordenados nas seguintes classes de frequência (Veggetti et al., 1990):

- Classe 1: Fibras com diâmetro $\leq 30 \mu\text{m}$;
- Classe 2: Fibras com diâmetro > 30 e $\leq 100 \mu\text{m}$;
- Classe 3: Fibras com diâmetro > 100 .

[023] Resultados obtidos: Desempenho Produtivo: O desempenho zootécnico da tilápia não foi afetado pelas dietas experimentais durante o estudo. Não houve efeito ($P > 0,05$) do cloridrato de ractopamina sobre os parâmetros de taxa de sobrevivência, ganho de biomassa, conversão alimentar, taxa de crescimento específico, rendimento de carcaça, taxa de eficiência protéica, índice hepatosomático e índice viserosomático. (Tabela 4).

[024] Composição química do filé: O tratamento com 40ppm de cloridrato de ractopamina nas amostras de 20 e 40 dias apresentou os menores valores de lipídio total nos filés de peixe e os maiores índices de proteína, ambos com diferenças estatisticamente significativas (Tabelas 5, 6 e 7). Comparando com o tratamento controle com 0 ppm de cloridrato de ractopamina e 40 dias de exposição, os lipídios totais diminuíram de 19,04% para 14,50% (com 20ppm) e para 14,62% (com 40ppm). Esses dados representam uma diminuição de aproximadamente 24% em relação ao tratamento controle (Tabelas 5, 6 e 7). Enquanto isso, o teor de proteína no filé aumentou de 80,79% do tratamento controle para 85,34% e 85,23% no tratamento com 20ppm e 40ppm, ambos aos 40 dias, respectivamente. Isso representou um aumento de 5,70% e 5,50%, respectivamente, em relação ao tratamento controle (Tabelas 5, 6 e 7).

[025] Perfil de ácidos graxos: Em comparação ao tratamento controle, os peixes alimentados com 20 ppm de ractopamina e também após 20 dias apresentaram um aumento de 1765% no teor de ácido linolênico, passando de uma concentração de 0,25% para 4,66% (Tabela 7).

[026] Músculo Morfométrico: A porcentagem do diâmetro das

fibras musculares por tratamento é mostrada na Tabela 7. Não foram observados efeitos significativos na hiperplasia ou hipertrofia das fibras musculares brancas em peixes alimentados com os níveis de suplementação de ractopamina em relação aos peixes alimentados com dieta controle.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de fabricação de composições de nutrição animal, **caracterizado** pelo fato de compreender as seguintes etapas:

a) uso de aditivo em concentração e forma de processamento específico em nova fórmula de ração balanceada extrusadas para peixes tropicais, composição animal;

b) método de processamento da ração extrusadas com cloridrato de ractopamina para obtenção de filé de peixe e carne de pescado magra "light" para indústria animal.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que na etapa a, a ração balanceada deve ser utilizada nas proporções indicadas para obtenção da etapa b.

3. Composição de nutrição animal, obtido conforme processo definido na reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende na inclusão de até 40 ppm de cloridrato de ractopamina em rações extrusadas para peixes tropicais em sua formulação.

4. Composição de nutrição animal, de acordo com as reivindicações 1 e 3, **caracterizado** pelo fato de compreender preferencialmente entre 20 a 40 ppm do aditivo alimentar cloridrato de ractopamina em sua formulação durante 40 dias de aplicação nos animais.

5. Uso de composições de nutrição animal, obtidas conforme definido nas reivindicações 1, 3 e 4, **caracterizado** por ser na preparação de uma formulação para ração de aquicultura.

6. Uso de composições de nutrição animal, obtidas conforme definido nas reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5,

caracterizado por ser na preparação de uma formulação para ração de peixes.

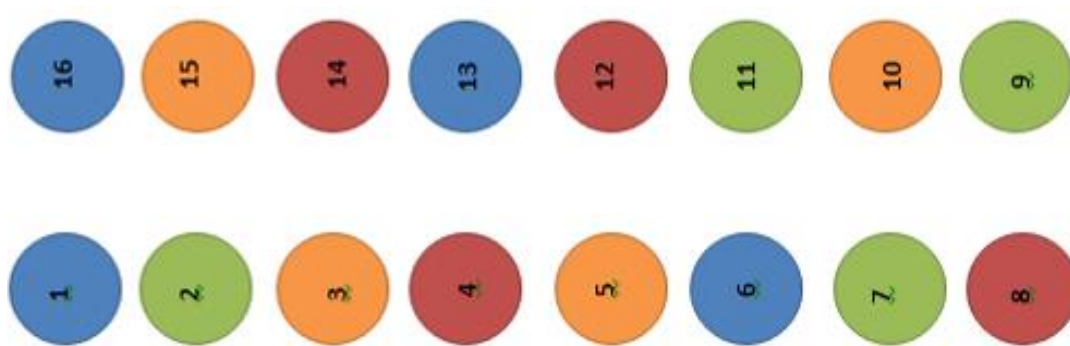
FIGURAS



Figura 1. Descrição das etapas de fabricação das dietas contendo o aditivo C. ractopamina.

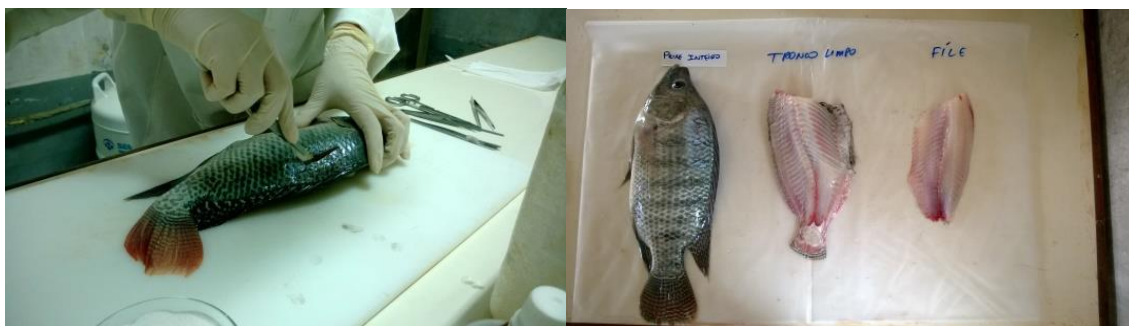


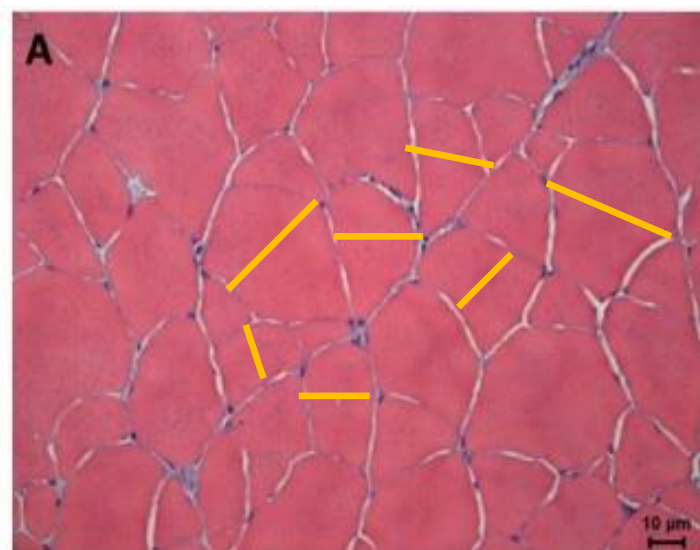
Demonstração da infraestrutura de teste



Dimensionamento e delineamento experimental validados

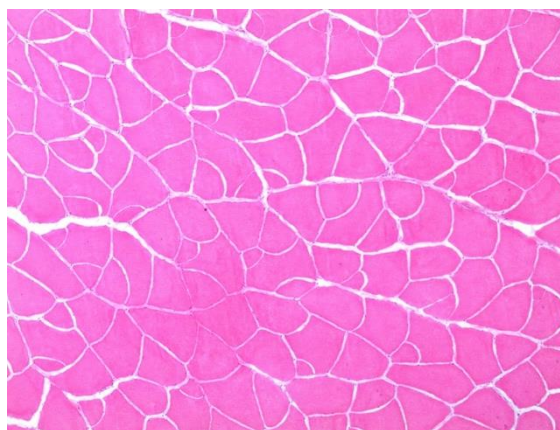
Figura 02. Demonstra a infraestrutura de testes e validação do protótipo da ração balanceada com nível de maturidade tecnológica TRL=6.





A - Tratamento de 20 dias y 0ppm.
Pez n° 9

B - Tratamento de 20 dias y
40ppm. Pez n° 33



C - Tratamento de 40 dias y 0ppm.
Pez n° 67.

D - Tratamento de 40 dias y
40ppm; Pez n° 89

Figuras 3. Processamento e análise dos filés de pescado e imagens das fibras musculares dos peixes indicando a

diminuição de deposição de gordura e a obtenção do filé magro "light".

Tabela 1

Tabela 1. Ingredientes e composição das dietas/rações extrusadas.

Ingredientes	Quantidades* (kg)	Porcentagem (%)
Antioxidante (BHT)	0,009	0,107
Calcáreo calcítico	0,0321	0,249
Fosfato dicálcico	0,0747	30,0
Farinha de arroz quiseira	9,0	4,787
Farinha de carne e ossos	1,4361	3,334
Farinha de peixe	1,0002	15,0
Farinha de vísceras de aves	4,5	27,215
Farelo de soja	8,1645	18,146
Farelo de milho	5,4438	0,182
Óleo de soja	0,0546	0,6
Suplemento mineral vitamínico - PREMIX	0,18	0,05
Anti-fungo (propanoato de cálcio)	0,015	0,3
Sal	0,09	0,03
Cloridrato de ractopamina** (dieta 10 ppm)	0,150	0,001%
Cloridrato de ractopamina** (dieta 20 ppm)	0,300	0,002%
Cloridrato de ractopamina** (dieta 40 ppm)	0,600	0,004%
Composição (%)		
Matéria seca	92,52	
Proteína (matéria seca)	34,98	
Lípido (matéria seca)	6,51	
Cinzas	6,70	
Energia (kcal.kg ⁻¹)	3.318	

* quantidade utilizada em cada tratamento

** concentração de 2,00% de ractopamina

Tabela 2. Apresenta as condições técnicas empregadas para elaboração dos processos de produção da ração extrusadas em condições específicas para esta nova fórmula desenvolvida.

Condiciones técnicas de extrusión de los pellets	
Temperatura de extrusión	100°C
Amperaje	12A
Tornillo de accionamiento	20Hz
Velocidad de corte/cuchillo	9,2Hz
Cantidad de agua	90cm ³ /min
Tamaño de la matriz para la extrusión	3,7 mm

Tabela 03. Composição e análise dos ingredientes que compõe as rações testadas com o aditivo C. ractopamina.

Nutriente	Boscolo, Hayashi y Meurer (2002)	NRC - Nutrient Requirements of Fish and Shrimp (2013)
Proteína	320g/kg ⁻¹	29%
Lípidos	5g/kg ⁻¹	-
Energía	3.250 kcal/kg ⁻¹	3.200 kcal/kg ⁻¹

Tabela 4. Demonstra o desempenho zootécnico e eficiência da produção de tilápia em sistema de recirculação que consumiram a nova formulação das rações contendo níveis de 10, 20 e 40 ppm de cloridrato de ractopamina.

Dose	Dias	Peso (g)		GB (g) ¹	TS% ²	FCR ³	SGR ⁴	RC% ⁵	EP ⁶	IH ⁷	IVS ⁸
		Inicial	Final								
0	20	518.33	569.97	51.37 ^a	96.42 ^a	1.82 ^a	0.35 ^a	92.84 ^a	2.25 ^a	1.70 ^a	7.15 ^a
	40	595.46	628.26	32.80 ^a	93.00 ^a	3.96 ^a	0.46 ^a	92.17 ^a	1.03 ^a	2.09 ^a	7.82 ^a
10	20	510.05	561.81	51.76 ^a	96.00 ^a	1.99 ^a	0.54 ^a	92.61 ^a	1.89 ^a	2.29 ^a	7.38 ^a
	40	546.47	578.02	31.55 ^a	93.00 ^a	5.96 ^a	0.41 ^a	91.14 ^a	0.69 ^a	2.37 ^a	8.86 ^a
20	20	531.94	582.61	50.67 ^a	92.00 ^a	1.99 ^a	0.41 ^a	92.03 ^a	1.84 ^a	2.45 ^a	7.96 ^a
	40	613,72	640.22	26.50 ^a	85.00 ^a	2.39 ^a	0.35 ^a	91.27 ^a	0.81 ^a	2.28 ^a	8.72 ^a
40	20	517.18	572.20	55.02 ^a	100.00 ^a	2.73 ^a	0.53 ^a	92.46 ^a	1.77 ^a	2.13 ^a	7.53 ^a
	40	591.45	640.75	49.30 ^a	90.00 ^a	2.42 ^a	0.67 ^a	91.29 ^a	1.38 ^a	2.18 ^a	8.70 ^a
Valor de P				0.5868	0.8880	0.1095	0.5053	0.8465	0.4375	0.6422	0.8458

A diferença significativa (P>0.05) é indicada pela letra em exponencial de cada parâmetro. Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas.

¹Ganho de biomassa (GB); ²Taxa de sobrevivência (TS); ³Conversão alimentar (FCR); ⁴Taxa de crescimento específico (SGR); ⁵Rendimento de carcaça (RC); ⁶Taxa de eficiência proteica (EP); ⁷Índice hepatossomático (IH); ⁸Índice viscerossomático (IVS).

Tabela 5. Efeitos das doses e dias de tratamento do cloridrato de ractopamina sobre as variáveis químico-bromatológicas dos filés de tilápia.

Doses	Dias	Lipídios%*	Proteína%*	Umidade%	Cinzas%
0	20	19.52 ^a	80.31 ^b	67.29 ^a	0.053 ^a
	40	19.04 ^a	80.79 ^b	67.13 ^a	0.054 ^a
10	20	20.52 ^a	79.33 ^b	67.97 ^a	0.046 ^a
	40	17.98 ^{ab}	81.85 ^{ab}	67.19 ^a	0.053 ^a
20	20	20.82 ^a	79.05 ^b	68.94 ^a	0.039 ^a
	40	14.50 ^b	85.34 ^a	69.10 ^a	0.044 ^a
40	20	16.68 ^{ab}	83.16 ^{ab}	69.18 ^a	0.043 ^a
	40	14.62 ^b	85.23 ^a	68.55 ^a	0.046 ^a
Valor de P		0.0273	0.0272	0.765	0.849

A diferença significativa (P>0.05) é indicada pela letra em exponencial de cada parâmetro. Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas. *Os parâmetros são apresentados em base úmida.

Tabela 6. Efeitos das doses e dias de tratamento do cloridrato de ractopamina sobre a composição de ácidos graxos nos filés de tilápias.

Doses	Dias	C13:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Σ Sat	Σ Mono	Σ Poli	n-3/n-6
0	20	9.86 ^a	2.50 ^a	26.10 ^a	4.57 ^a	6.77 ^a	34.41 ^a	11.79 ^a	0.25 ^b	45.25 ^a	38.99 ^a	3.59 ^a	3.33 ^a
	40	10.57 ^a	2.46 ^a	24.60 ^a	5.02 ^a	6.33 ^a	34.50 ^a	10.77 ^a	1.21 ^{ab}	43.98 ^a	39.53 ^a	9.27 ^a	5.69 ^a
10	20	14.00 ^a	1.64 ^a	16.47 ^a	3.16 ^a	2.99 ^a	30.95 ^a	27.40 ^a	4.66^a	35.12 ^a	34.11 ^a	32.07 ^a	7.56 ^a
	40	15.18 ^a	2.46 ^a	19.46 ^a	4.42 ^a	4.40 ^a	28.96 ^a	21.66 ^a	1.21 ^{ab}	41.52 ^a	33.38 ^a	16.74 ^a	9.26 ^a
20	20	7.80 ^a	1.83 ^a	26.56 ^a	4.72 ^a	6.43 ^a	37.96 ^a	14.82 ^a	0.31 ^b	42.63 ^a	42.69 ^a	4.58 ^a	3.42 ^a
	40	7.44 ^a	2.18 ^a	25.90 ^a	4.61 ^a	6.41 ^a	37.76 ^a	14.15 ^a	2.00 ^{ab}	41.95 ^a	38.37 ^a	13.29 ^a	7.14 ^a
40	20	7.39 ^a	2.38 ^a	23.48 ^a	4.60 ^a	5.98 ^a	38.00 ^a	13.01 ^a	0.60 ^{ab}	39.25 ^a	42.61 ^a	7.59 ^a	5.82 ^a
	40	8.00 ^a	2.26 ^a	25.44 ^a	4.82 ^a	6.17 ^a	36.82 ^a	12.55 ^a	0.73 ^{ab}	41.89 ^a	41.64 ^a	7.31 ^a	4.79 ^a
Valor de P		0.9791	0.7518	0.6147	0.8249	0.3653	0.8212	0.7692	0.0363	0.2212	0.7835	0.1706	0.7482

A diferença significativa ($P>0.05$) é indicada pela letra em exponencial de cada parâmetro. Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas. *Os parâmetros são apresentados em base húmida. C13:0 = ácido tridecanóico, C14:0 = ácido mirístico, C16:0 = ácido palmítico, C16:1 = ácido palmitoléico, C18:0 = ácido esteárico, C18:1 = ácido oléico, C18:2 = ácido linoléico, C18:3 = ácido linolénico, Σ Sat = suma de los ácidos grasos saturados, Σ Mono = suma de los ácidos grasos monoinsaturados, Σ Poli = suma de los ácidos grasos poli-insaturados, n-3/n-6 = relación del ácido graso omega 3 con omega 6.

Tabela 7. Efeitos das doses e dias de tratamento do cloridrato de ractopamina sobre as classes de fibras musculares.

Doses	Dias	Fibras < 30 µm	Fibras > 30 y ≤100 µm	Fibras > 100
0	20	13.25 ^a	165.37 ^a	187.25 ^a
	40	7.75 ^a	144.37 ^a	186.87 ^a
10	20	31.37 ^a	205.00 ^a	186.37 ^a
	40	24.50 ^a	106.37 ^a	149.12 ^a
20	20	31.50 ^a	165.00 ^a	151.62 ^a
	40	12.37 ^a	126.50 ^a	161.37 ^a
40	20	18.37 ^a	118.00 ^a	141.87 ^a
	40	6.37 ^a	133.62 ^a	186.25 ^a
Valor de P		0.2766	0.2766	0.1219

A diferença significativa ($P>0.05$) é indicada pela letra em exponencial de cada parâmetro. Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas. *valores médios das medidas das fibras musculares em micrómetros (µm), média de 346 fibras por área.

RESUMO**Processo de fabricação de composições de nutrição animal, produto obtido e uso do mesmo**

A presente invenção se insere no campo da biotecnologia e nutrição animal, aplicando processos biotecnológicos para produção de rações balanceadas específicas que permitem a melhoria na qualidade de carne de devido a utilização de composições de nutrição animal, contendo aditivo alimentar com níveis de inclusão de 20 a 40 ppm de cloridrato de ractopamina em sua composição sob consumo contínuo por 40 dias na produção de peixes tropicais. A aplicação de processos biotecnológicos para obtenção de novos produtos e produção animal que permite a melhoria na qualidade de carne na criação de peixes é uma nova alternativa viável de produto e processo para empreendimentos aquícolas, além de agregar valor para organizações e empresas que visam aplicar processos inovadores e seguros de produção, gerando produtos/ pescados mais saudáveis que atendem à mercados diferenciados. Mais particularmente, a presente invenção refere-se ao processo de obtenção de composições de nutrição animal, produto obtido e seu uso como ração em aquicultura.