

FRANCO MARIA LAJOLO

ESTUDO BROMATOLÓGICO DE CONCENTRADOS PROTÉICOS
DE SARDINELLA AURITA E DE TILÁPIA MELANOPLÉURA
OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM ISOPROPANOL

TESE APRESENTADA À FACULDADE
DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR,

SÃO PAULO

1969

Os nossos melhores agradecimentos

*Ao PROF. MARIA APARECIDA POURCHET CAMPOS,
pela orientação desta tese.*

*Ao DR. JOÃO BATISTA DOMINGUES,
pelas oportunas sugestões apresentadas.*

*Ao DR. SÉRGIO MIGUEL ZUCAS,
pela ajuda na realização deste trabalho.*

*Ao DR. MYAKI ISSÁO e sua equipe,
pela cooperação prestada.*

SUMÁRIO

1 - PROPOSIÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 - A OBTENÇÃO DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS - VALOR DA PROTEÍNA.....	3
2.2 - MINERAIS NOS CONCENTRADOS PROTÉICOS.....	9
3 - MONTAGEM DA EXPERIÊNCIA.....	14
4 - MATERIAL UTILIZADO.....	16
4.1 - PEIXES.....	16
4.2 - ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO.....	16
4.3 - GAIOLA.....	17
4.4 - RAÇÕES.....	17
4.4.1 - Ração de base.....	17
4.4.2 - Rações experimentais.....	18
5 - MÉTODOS.....	21
5.1 - PREPARO DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS.....	21
5.2 - PREPARO DAS RAÇÕES.....	22
5.3 - AVALIAÇÃO DO APROVEITAMENTO BIOLÓGICO.....	22
5.3.1 - Rações.....	22
5.3.2 - Proteína.....	22
5.3.3 - Minerais.....	23
5.4 - ANÁLISE DA CARCAÇA.....	23
5.4.1 - Preparo do material para análise.....	23
5.4.2 - Determinações.....	24
5.4.2.1 - Umidade.....	24
5.4.2.2 - Extrato etéreo.....	24
5.4.2.3 - Resíduo mineral fixo.....	24
5.4.2.4 - Nitrogênio.....	24
5.4.2.5 - Minerais (exceto flúor).....	24
5.4.2.6 - Determinação do flúor.....	24
5.4.2.7 - Determinação dos aminoácidos.....	25

5.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
6 - DADOS ANALÍTICOS.....	26
6.1 - COMPOSIÇÃO DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS.....	26
6.2 - CURVA DE PÊSO DOS ANIMAIS.....	29
6.3 - COEFICIENTE DE EFICÁCIA PROTÉICA E COEFICIENTE DE EFICÁCIA ALIMENTAR.....	31
6.4 - RESULTADOS OBTIDOS PELA ANÁLISE DAS CARCAÇAS.....	33
6.4.1 - Pêso e composição centesimal das carcaças.....	33
6.4.2 - Aproveitamento percentual do nitrogênio ingerido.....	35
6.4.3 - Aproveitamento percentual do cálcio, do fósforo e do flúor ingeridos.....	37
6.5 - TABELA GERAL.....	41
7 - ANÁLISE DOS DADOS.....	43
7.1 - CONCENTRADOS PROTÉICOS.....	43
7.2 - COEFICIENTE DE EFICÁCIA ALIMENTAR (C.E.A.) E COEFICIENTE DE EFICÁCIA PROTÉICA (C.E.P.).....	43
7.3 - APROVEITAMENTO PERCENTUAL DO NITROGÊNIO INGERIDO.....	44
7.4 - APROVEITAMENTO PERCENTUAL DO CÁLCIO INGERIDO	44
7.5 - APROVEITAMENTO PERCENTUAL DO FÓSFORO INGERIDO.....	44
7.6 - APROVEITAMENTO PERCENTUAL DO FLÚOR INGERIDO.	45
8 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	46
8.1 - OS CONCENTRADOS.....	46
8.2 - ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	51
8.2.1 - C.E.A., C.E.P., aproveitamento percentual do nitrogênio.....	51
8.2.2 - Aproveitamento dos minerais.....	55
9 - CONCLUSÕES.....	61
10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1 - PROPOSIÇÃO

A disponibilidade de alimentos nos dias atuais e, principalmente o quadro alimentar que enfrentaremos no futuro, em consequência da expansão demográfica, fazem ^{com} que o problema alimentar se transforme em um dos desafios máximos de nossa época, precisando ser encarado com disposição por todos os que têm responsabilidade na procura de soluções.

Na verdade, à medida que as populações aumentam, tornam-se críticas suas necessidades alimentares, sendo possível dizer que estas, nas próximas décadas, dificilmente poderão ser atendidas pelos meios convencionais da agricultura e da pecuária.

Dentro disso, um dos pontos mais sérios do binômio população/produção de alimentos é o da deficiência de proteínas. Para a diminuição desse desequilíbrio, devemos salientar a importância que assumem os peixes e pescados. Infelizmente, porém, grande parte desse potencial tem sido desperdiçada, em razão de sua fácil perecibilidade e da falta de racional aproveitamento da matéria prima fornecida pela natureza.

Os concentrados protéicos de peixe, produzidos a partir de peixes inteiros ou de resíduos de sua industrialização, oferecem a vantagem de um elevado valor biológico pelos aminoácidos presentes, um alto teor mineral, possibilidade de boa aceitação para consumo do homem e baixo custo operacional. São,

ainda, de fácil conservação, o que constitui importante fator para seu aproveitamento, principalmente em condições adversas de clima.

Considerando a nossa extensão costeira, o grande volume de nossas águas fluviais e as possibilidades de expansão das indústrias da pesca e da piscicultura, os peixes e os produtos deles derivados assumem grande importância como manancial de alimentos de alta qualidade para o Brasil.

Assim, procurando contribuir para o conhecimento de nosso potencial alimentar, propusemo-nos estudar o valor nutritivo da Sardinella aurita e da Tilápia melanopleura, na forma de concentrados protéicos obtidos por desidratação, desengorduramento e desodorização com isopropanol.

O nosso trabalho foi orientado, numa primeira etapa, no sentido de determinar:

a) a composição centesimal, a composição mineral e a de aminoácidos dos concentrados.

b) o valor biológico da proteína e do complexo protéico-mineral dos concentrados.

Numa segunda etapa, procuramos avaliar o potencial que êsses produtos poderão representar no fornecimento de certos minerais para o organismo, ensaiando, em ratos, o aproveitamento do cálcio, do fósforo e do flúor nêles presentes.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - A obtenção dos concentrados protéicos -

Valor da proteína

Foi a elevada potencialidade dos mares, rios e lagos, como fonte de alimentos de alta qualidade, que estimulou estudos no sentido da produção e utilização de concentrados de peixes para a alimentação do homem.

Nem sempre, porém, êstes apresentam as condições exigidas para consumo humano, razão pela qual se procurou estabelecer normas para sua produção e contrôle, com a finalidade de torná-los compatíveis com o uso proposto. Tais produtos, dos quais a água e a gordura são retiradas, passaram a ser denominados "farinhas de peixe" e, mais recentemente, "concentrados protéicos de peixe" permanecendo a denominação fish meal, dos países de língua inglesa, para o produto destinado ao uso animal.

Básicamente, estabeleceram-se dois tipos principais de concentrados protéicos de peixe [FAO (18)]: tipo A, desengordurado e desodorizado, destinado a populações que não apreciam o odor do peixe (contendo no máximo 0,7% de lípidos); tipo B, que pode conter até 3% de gordura, destinado a populações habituadas a êsse gosto e odor. No Brasil, devido aos hábitos tradicionais de nossa população, parece-nos que o tipo A teria preferência. Releva, ainda, salientar que o tipo A não apresenta o inconveniente da rancificação, com o desen-

volvimento de odores estranhos e formação de compostos nocivos | KONING e McMULLAN (35) OLCOTT (72) |.

A maior parte dos métodos utilizados para a produção de concentrados protéicos tipo A baseia-se no emprego de solventes.

O processo usado pela "Viobin", de Monticello (Illinois), originalmente idealizado por LEVIN (46), utiliza o 1,2-dicloroetano para a desidratação e desengorduramento, sendo o metanol, etanol ou isopropanol empregados para a desidratação.

No Canadá foram desenvolvidos processos que empregam apenas isopropanol | GUTTMANN e VANDENHEUVEL (25), POWER (79) |; recentemente, foi aprovado, nos Estados Unidos, processo do "Bureau of Commercial Fisheries" de Maryland (99), que também utiliza este solvente.

Em Quintero, no Chile, com o auxílio da UNICEF*, o concentrado obtido do Merluccius gayi é produzido com misturas de hexano-etanol, ou apenas etanol, sendo o peixe previamente dessecado | YÁÑEZ e col. (103) |. O etanol é também utilizado pelo FIRI (Fishing Industries Research Institute), na África do Sul, para obter farinhas de sardinha, jurel e merluzza | DREOSTI (15) |. Em Agadir, no Marrocos, com o auxílio da FAO, iniciou-se, há algum tempo, a produção de concentrados (principalmente de sardinhas previamente cozidas e prensadas) por tratamento com misturas de solventes como hexano, acetato de etila e isopropanol | KNOBL (34) |.

Como o produto é destinado a fornecer nutrientes de alta qualidade, o valor nutricional do insumo deve ser mantido. Os dados referentes ao valor biológico da proteína de diversos concentrados protéicos já ensaiados indicam que isso é possível.

Os concentrados protéicos obtidos pelo 1,2-dicloroetano foram estudados por vários autores: METTA (56) encontrou, para os concentrados da "Viobin", coeficientes de eficácia protéica próximos aos da proteína do ovo; SCHENDEL e JOHNSON (83) estudaram, comparativamente, os concentrados da "Viobin" e a caseína, como fontes protéicas na reprodução de ratos, até a quarta geração. Encontraram melhores resultados para os con-

(*) United Nations Children's Fund

centrados da "Viobin".

JAFFÉ (32) ensaiou concentrado da mesma procedência, obtendo coeficiente de eficácia protéica da mesma ordem que o da caseína. Por outro lado, o valor biológico da proteína, medido pela utilização protéica líquida revelou ser o concentrado ligeiramente superior à caseína.

Este autor verificou, ainda, que a adição de metionina elevava o valor biológico da proteína, evidenciando uma deficiência desse aminoácido no produto. O concentrado, adicionado na proporção de 20% a uma ração contendo apenas milho amarelo moído ("funche"), sem suplemento vitamínico ou mineral, fornecido a ratos através de duas gerações, não mostrou toxicidade nem evidenciou deficiências alimentares quando comparado a uma ração comercial (purina).

GOYCO e ASENJO (24) encontraram, para um concentrado da mesma procedência, valores elevados relativamente ao coeficiente de eficácia protéica, bem como para o "índice de lactância"* da proteína.

Recentemente, MURNO e MORRISON (67) (68), estudando a bioquímica dos concentrados protéicos de filés de Gadus morrhua, obtidos por meio de 1,2-dicloroetano, observaram a formação de composto de interação do peixe com o solvente. Esse composto, o cloreto de 2 cloroetil-trimetilamônio, não é totalmente extraído pelo metanol, no processo de tratamento e, o concentrado, fornecido a ratos na proporção de 50% na ração, mostrou-se altamente tóxico.

YÁNEZ e col. (103) relataram a qualidade dos concentrados protéicos obtidos em Quintero, por utilização de hexano e ou etanol. A análise de várias partidas mostrou, na utilização protéica líquida, valores de 63,5 a 73,9, sendo de 71,3 para a caseína. Os mesmos autores constataram, também, que ratos alimentados durante catorze semanas, com rações contendo 24% de um dos produtos obtidos por meio de etanol, mostraram crescimento semelhante ao de animais alimentados com caseína.

..-.-.-

(*) "índice de lactância", segundo os autores, corresponde à variação de peso do conjunto mãe-ninhada (até os 14 dias de idade) por grama de proteína ingerida nesse período.

Teste com rações contendo 30% de outro produto, obtido por extração com hexano e etanol, oferecidas a ratos por três gerações, revelaram ser a proteína de boa qualidade, sem evidenciar toxicidade. A adição de lisina não elevou o valor biológico da proteína que, entretanto, era aumentado pela adição de metionina.

O valor biológico da proteína e a composição de concentrados obtidos na África do Sul, por meio de etanol e a partir de peixes como jurel, sardinhas e merluzza, foram apresentados por DREOSTI (15) (16). A sua utilização protéica líquida foi comparável à da caseína e à de concentrados da "Viobin".

Na Índia, LAHIRY e col. (37) prepararam, em laboratório, concentrados de sardinha (Clupea longiceps), usando o etanol como solvente. O produto obtido foi armazenado em latas e conservou, durante doze meses, as suas propriedades organolépticas, mostrando-se bastante aceitável para consumo. O seu coeficiente de eficácia protéica revelou-se próximo ao do leite desnatado [SHURPALEKAR e col. (37)]. A análise dos aminoácidos essenciais de um concentrado da mesma origem foi realizada por KADKOL e LAHIRY (33).

Nas Filipinas, ALCAREZ - BAYAN (1) prepararam, também em laboratório, concentrados do anchovas (Stolephorus sommersoni) secas ao sol. A extração foi feita por meio de etanol, e os concentrados resultantes mostraram-se inodoros e insípidos, apresentando conteúdo de aminoácidos e valor biológico comparáveis aos da caseína.

Vários concentrados já foram, também, produzidos por meio de isopropanol, dando origem a produtos de alto valor nutricional.

Um concentrado protéico de músculo de bacalhau, obtido por extração com isopropanol, foi testado por MORRISON e CAMPBELL (61), que verificaram ser o seu coeficiente de eficácia protéica superior ao da caseína, se comparados ao nível de 7 ou 10% de proteína na ração; todavia, ao nível de 15%, as duas proteínas mostraram o mesmo coeficiente. Os autores não notaram diferença significativa no peso do fígado, de rins e de supra-renais, de animais alimentados com ambas as proteínas, nem tampouco no teor de lípidos hepáticos.

LARSEN e HAWKINS (40) estudaram um produto análogo, que se mostrou superior à caseína e à albumina do ovo. Verificaram que farinhas de vísceras e de fígado de peixes possuem baixo valor biológico.

POWER (73) conseguiu concentrados de arenques (peixe gorduroso) e de bacalhau, obtidos com isopropanol. O autor utilizou arenques inteiros e várias porções de bacalhau (músculo, bacalhau descabeçado, descabeçado e esviscerado e restos da filetagem). O coeficiente de eficácia protéica que observou foi elevado, em comparação ao da caseína (2,50). O fato foi nítido nos concentrados de bacalhau integral (2,64), de músculo (2,97) e de arenque (2,74). Foi particularmente elevado o teor de lisina nos concentrados, que mostraram boas qualidades organolépticas.

Recentemente, o "Bureau of Commercial Fisheries" divulgou um processo desenvolvido em seus laboratórios e utilizável comercialmente (99), baseado na extração com isopropanol a partir de peixe dos gêneros Urophycis, Merluccius e Theragra. A produção experimental em laboratório, com o Urophycis chuss, mostrou a possibilidade da obtenção de um produto inodoro, insípido, estável mesmo após 9 meses de armazenamento e com alto teor de lisina utilizável. O teor de metionina também foi elevado e o coeficiente de eficácia protéica superior ao da caseína. Testado exaustivamente, o produto não se mostrou tóxico para ratos.

Parece-nos interessante verificar o valor nutricional de concentrados obtidos com outras espécies, especialmente de peixes gordurosos, que são os que representam, segundo LOVERN (47), os maiores potenciais pesqueiros, em grande parte desviados para a alimentação animal na forma de farinhas.

Poucos estudos existem sobre concentrados protéicos de peixes de água doce. Dentre os autores que se interessaram pelo assunto, podemos citar: DE (3), MARCH e col. (52) que estudaram concentrados não desengordurados. Por outro lado, DE e HANNAM (9) prepararam produtos desodorizados que, testados por DE e col. (10) em ratos jovens, mostraram valor máximo da eficácia protéica ao nível de 10% de proteína na ração. Em 6 amostras ensaiadas, os valores variaram de 1,9 a 2,3 | DE e col.

(11)!

Nos vários concentrados desodorizados obtidos a partir de diferentes métodos e matérias-primas, verificaram-se frequentemente grandes variações no valor biológico da proteína. BENDER e HAIZELBEN (4), analisando produtos de diversas origens, encontraram variação de 18 a 80 nos valores indicativos da utilização protéica líquida. MORRISON e McLAUGHAN (62) e MORRISON e SABRY (64) também constataram variações na eficácia protéica de diversos concentrados obtidos por diferentes métodos; os menores valores foram encontrados em amostras com sinais de superaquecimento, as quais mostraram, também, uma diminuição do teor de lisina e de metionina utilizáveis. A importância do tipo de tratamento térmico já foi ressaltada por DONOSO e col. (13), LEA e col. (43), SAMBUCETTI e SANAHUJA (81) e por YÁÑEZ e DONOSO (102).

MORRISON (60), passando em revista trabalhos de vários autores, ressaltou a importância que podem ter o método empregado e o solvente usado, na qualidade do produto final.

MORRISON e col. (65) estudaram comparativamente, produtos obtidos com 1,2-dicloroetano e com isopropanol a partir das mesmas matérias-primas: peixe total, músculo e resíduos da filetagem desses peixes. Encontraram variações do coeficiente de eficácia protéica, que tendia a ser maior no concentrado obtido com músculos, e intermediário nos obtidos com peixe total; a diferença, porém, só era significativa ao nível de 10% de proteína na ração e não no de 20%. Os concentrados obtidos com isopropanol eram superiores aos obtidos com dicloroetano, ao nível de 10% de proteína, desaparecendo a diferença quando esse nível era de 20%. As taxas de lisina e metionina totais, bem como a de metionina digerível, eram mais altas nos produtos obtidos por meio de isopropanol. O estudo evidenciou a importância das partes consideradas dos peixes, do nível de proteína no ensaio e do solvente usado, em relação ao valor biológico do concentrado. KURTZMAN e SNYDER (36) também encontraram diferenças no valor biológico da proteína, como resultado do método empregado e da parte aproveitada do peixe.

DONOSO e YÁÑEZ (12) constataram menor utilização protéica a partir de produtos desengordurados por eta-

no1, em comparação aos mesmos produtos, porém não desengordurados.

A influência do 1,2-dicloroetano foi particularmente estudada. Assim, MORRISON (59) verificou, num concentrado preparado com este solvente, a destruição de parte da histidina e a existência de histidina e metionina não utilizáveis por ratos e que não eram liberadas por hidrólise enzimática "in vitro". Este efeito era menor noutro concentrado preparado com isopropanol. MORRISON e MURNO (63) compararam produtos obtidos com hexano, etanol, isopropanol e dicloroetano, verificando que este último causava mais extensa destruição da cistina e da histidina, diminuindo, além disso, a capacidade de liberação desses dois aminoácidos, e também a da metionina, por hidrólise enzimática. Sugeriram que tal fato poderia ser devido à interação do solvente com os grupos sulfidrila da proteína.

HOWE e Col. (29), estudando o valor biológico da proteína de concentrados produzidos a partir de bacalhau, no Canadá, e dos produzidos em Quintero, verificaram que a adição de metionina, de lisina ou de ambos, não provocava aumento dos coeficientes de eficácia protéica, que eram superiores ao da caseína.

STILLINGS e Col. (94) estudaram, especificamente, o concentrado produzido pelo "Bureau of Commercial Fisheries", verificando que o seu coeficiente de eficácia protéica podia ser elevado pela adição de vários aminoácidos, sendo a metionina o principal.

Em 1967, o F.D.A. (Food and Drug Administration) aprovou dois processos para a obtenção de concentrados protéicos (98) : um, baseado na extração com 1,2-dicloroetano, e outro, com isopropanol. Este último, como já dissemos, foi desenvolvido pelo "Bureau of Commercial Fisheries" e testado com o Urophycis chuss, com bons resultados; desconhecemos, porém, seu uso em outras espécies de peixes.

2.2 - Minerais nos concentrados protéicos

Nos concentrados de peixe, além da riqueza

za em proteína, existe elevado teor de minerais. Poucos estudos, entretanto, têm sido levados a cabo sobre seu aproveitamento biológico.

Em trabalho realizado por SURE (97), dois concentrados protéicos, estudados como única fonte de minerais e proteínas de uma dada ração, mostraram-se tão eficazes na promoção do crescimento de ratos quanto uma ração isoprotéica (caseína) e isomineral (mistura salina de boa qualidade). DU BRUYN e DREYER (17) verificaram que farinhas de peixe sul-africanas, administradas a ratos jovens como única fonte de minerais, revelaram-se deficientes em potássio. JAFFÉ (32) não encontrou deficiências alimentares em ratos alimentados com ração contendo 80% de milho e 20% do concentrado protéico "Viobin", sem qualquer suplementação vitamínica ou mineral; não foram avaliados porém, os minerais fornecidos pelo milho.

Já foi verificado que o cálcio dos ossos de pequenos peixes é bem aproveitado pelo organismo (BASU e BASAK (3), LEVERTON e PAYAWAL (45)) | Estudos realizados com concentrados protéicos mostram fato idêntico: PRETORIUS e VEHEMEYER (80) obtiveram boa retenção de cálcio e fósforo em convalescentes de *kushiorokor* alimentados com dietas suplementadas por concentrado de peixe. SHURPALEKAR e col. (86) encontraram, também, boa retenção desses minerais em crianças alimentadas com dieta básica de arroz, suplementada com alimento vegetal contendo concentrado protéico de sardinha. SPENCER e col. (91), alimentando pessoas com dietas suplementadas por concentrado de peixe, verificaram fato análogo. SHAPIRO e col. (85) relataram, recentemente, que a adição de pequenas porcentagens de concentrado de peixe a dietas raquitogênicas melhorava os estados de raquitismo e osteoporose.

Os minerais dos concentrados de peixe, na opinião de vários autores, têm importância na prevenção da cárie dentária. BUTNER e MUHLER (6), OPUZYNSKA (74) e STEPHAN (92) (93), encontraram diminuição da ocorrência de cárie em animais alimentados com rações enriquecidas com os referidos concentrados. Este último verificou também que essa diminuição, evidente já com pequenas quantidades de concentrado, era proporcional à percentagem de suplemento adicionado à ração. Outros autores chegaram ao mesmo resultado, empregando quantidades ele

vadas de suplemento | NIZEL e col. (71), CHAYET e col. (7) |.

Como se sabe, o teor de flúor nos peixes e pescados é elevado | HARVEY (28), McLURE (48) (49),

SCHMITZ e DA SILVA (84), WALDBOTT (101) |, estando distribuído, principalmente, nos ossos e escamas | BROWN e col. (5) |, fato que explica a riqueza em flúor dos concentrados obtidos de peixes inteiros | DREOSTI (16), HADJIMARKOS (27), OLIVEIRA (73), ZIPKIN e col. (105) |.

O efeito benéfico observado na prevenção da incidência de cárie pode, eventualmente, ser atribuído ao halogênio, uma vez que já foi verificado que, entre certas populações que faziam largo uso de peixe na dieta, havia incidência significativa de esmalte manchado, ao lado da baixa incidência de cárie, apesar de a água não conter elevados teores de flúor | SOGNAES (88), SOGNAES e ARMSTRONG (89) |.

A possibilidade de poder a ingestão prolongada de concentrados protéicos de peixes acarretar o aparecimento de esmalte manchado foi lembrada por HADJIMARKOS (26) (27), que insistiu na necessidade de se fazerem estudos para conhecer com precisão o aproveitamento biológico do halogênio.

Essas observações devem chamar a atenção do bromatologista, porquanto podem, eventualmente, ter significado de alcance sanitário.

Com efeito, não mais se discute o fato de que concentrações de 1 ppm de flúor na água de beber são eficazes na prevenção da cárie e que quantidades ligeiramente superiores podem provocar fluorose dental

Aspectos já estudados do metabolismo do halogênio mostram que êle tende a fixar-se nos ossos de animais jovens em maior quantidade do que nos de animais velhos | ZIPKIN e McLURE (104) |, fato também verificado para o homem | JACKSON e WEIDMANN (30) |.

Por outro lado, dietas raquitogênicas provocam aumento da concentração de flúor nos ossos | ZIPKIN e col. (106) |; estados de desnutrição, especialmente a escassa ingestão de cálcio, já foram associadas a sintomas de fluorose | MASSLER e SHOUR (54), MURRAY e WILSON (69) |.

Todavia, o aproveitamento biológico do

do flúor natural dos alimentos é, geralmente baixo, havendo probabilidade de que o flúor dos concentrados de peixe não seja totalmente utilizado.

De fato, o alto conteúdo de cálcio e fósforo desses produtos pode diminuir a absorção e, portanto, a fixação do flúor. A influência dos íons referidos na fixação do flúor já foi apontada por vários autores: | DONOVAN e MUHLER (14), LAWRENZ e MITCHELL (41) (42), POURCHET-CAMPOS (76) (77), STOOKEY e col. (95) (96), WAGNER e MUHLER (100) |. Recentemente, num simpósio sobre o flúor, foi ressaltada a importância do conteúdo de cátions como Ca^{+2} e Mg^{+2} na prevenção de fluorose, em regiões cuja água tinha alta concentração de flúor | MARIER (53) |

Já foi demonstrado que o flúor na forma de fluorapatita é pouco absorvido | JACKSON e col. (31), LARGENT e HEYROTH (39), McLURE e col. (50) |; sabe-se, também, que o flúor presente nos ossos de peixe encontra-se sob essa forma de fluorapatita | BROWN e col. (5) |. Nestas condições, é lícito supor que o flúor dos concentrados de peixes também seja pouco aproveitado:

Confirmando tal suposição, podemos referir os trabalhos de MUHLER e STOOKEY (66), que constatarem o baixo aproveitamento do flúor contido em conchas de ostras; LEE e NILSON (44) estudaram a fixação do flúor natural presente no salmão e na cavala, verificando que era baixa e que correspondia a cerca de 1/3 da obtida com outras rações contendo NaF ou CaF_2 . Recentemente, PETERS (75) obteve aproveitamento de 6% do flúor ingerido, quando este era proveniente de lambaris.

Até agora, parece que os únicos trabalhos realizados para determinar a utilização biológica de flúor de concentrados de peixe foram os de SPENCER e col. (90) e os de ZIPKIN e col. (105). Estes últimos prepararam rações com concentrado de peixe Urophycis chuss, obtido por meio de isopropanol e contendo 20, 50 e 80 ppm de flúor; verificaram que o aproveitamento era, respectivamente, de 23, 18 e 13%. O aproveitamento de flúor dessa fonte foi inferior ao conseguido com rações contendo NaF , na mesma concentração. Todavia, SPENCER (90) encontrou aproveitamento equivalente para as duas fontes.

Recentemente, o F.D.A. (98) limitou em 100 ppm o conteúdo máximo de flúor em concentrados protéicos de peixes, admitindo uma ingestão diária de até 20 g do produto, como suplemento alimentar. Essa limitação decorreu da possibilidade aventada de poderem os teores elevados de flúor, existentes nos concentrados obtidos de peixe integral, vir a provocar sintomas de fluorose.

3 - MONTAGEM DA EXPERIÊNCIA

objetivo

A nossa experiência visou determinar o aproveitamento biológico da proteína e de alguns minerais presentes em concentrados protéicos desidratados, desengordurados e desodorizados, de tilápia e de sardinha.

Como proteína padrão, para efeito de comparação, utilizamos a caseína.

Os animais empregados foram 54 ratos albinos, alojados em gaiolas individuais e divididos em nove grupos de seis ratos.

Obtiveram-se assim os grupos T, S, T₁, S₁, C₁, T₂, S₂, C₂ e G⁰, que receberam o seguinte tratamento:

Grupos (1): T₁, S₁, C₁, submetidos a rações contendo 10% de proteína;

Grupos (2): T₂, S₂, C₂, submetidos a rações contendo 20% de proteína.

Nestes 6 grupos, as fontes de proteína foram, respectivamente: concentrado de tilápia (grupos T), de sardinha (grupos S) e caseína (grupos C); não receberam qualquer outra fonte de proteína na ração, mas receberam suplementação com mistura salina segundo níveis ótimos para o crescimento.

Grupos T e S - receberam rações contendo 10% da proteína dos dois concentrados respectivos, porém, sem qualquer suplementação mineral. Nestes grupos, portanto, os

concentrados representaram a única fonte de proteína e de minerais.

Grupo G⁰ - foi sacrificado no primeiro dia da experiência, para que pudéssemos obter a composição aproximada da carcaça dos animais no início da mesma, servindo os dados com controle inicial.

O planejamento descrito permitiu o estudo do valor biológico da proteína, bem como da utilização dos minerais.

4 MATERIAL UTILIZADO

4.1 - Peixes

Os peixes utilizados foram: tilápia (Tilapia melanopleura, Cichlidae) e sardinha (Sardinella aurita, Clupeidae), capturados no mês de setembro. Usamos peixe total, sem a retirada de escamas, vísceras ou cabeças.

a) Tilápia - foi obtida nos tanques de criação da Estação Experimental de Piscicultura de Piraquunga(*). Os peixes capturados, de ambos os sexos, mediam de 9 a 16 cm de comprimento e foram transportados para o laboratório em caixas de isopor, contendo gelo. Foram lavados em água, triturados no mesmo dia em moedor de carne, misturados com isopropanol e processados no dia seguinte.

b) Sardinha - foi obtida no comércio local, medindo de 13 a 18 cm de comprimento. Sofreu o mesmo tratamento que o do material anteriormente referido.

4.2 - Animal de experimentação

O animal utilizado foi o Rattus norvegicus, var. albinus Rodentia, macho, de idade entre 23 e 25 dias, da raça "Wistar", obtido a partir de colônias mantidas em nosso laboratório.

-.--o--o--

(*).Agradecemos ao Dr. Fuad Algazur, da Estação Experimental de Piscicultura de Piraquunga, a atenciosa cooperação representada pelo fornecimento dos peixes.

4.3 - Gaiola

A gaiola utilizada foi do tipo metabólico, idealizada em nosso laboratório [ZUCAS e col. (108)]. Ela permite, com um bom grau de precisão, o controle da ração ingerida fornecendo elevado índice de recuperação.

4.4 - Rações

4.4.1 - Ração de base

A ração de base, isenta de proteína, tinha a seguinte composição:

Amido de milho.....	76%
Sacarose.....	10%
Óleo de soja.....	8%
Mistura vitamínica.....	1%
Mistura salina.....	4%
Celulose.....	1%
Ácido benzóico.....	0,1%

A mistura salina utilizada apresentava a seguinte composição

Carbonato de Cálcio.....	16,600 %
Fosfato Tricálcico.....	47,300%
Sulfato de Cobre.....	0,017 %
Citrato Férrico.....	0,333 %
Sulfato de Magnésio.....	5,000 %
Sulfato de Manganês.....	0,417 %
Cloreto de Potássio.....	11,600 %
Iodeto de Potássio.....	0,017 %
Cloreto de Sódio.....	6,600 %
Fosfato de Sódio Dibásico.....	11,600 %
Carbonato de Zinco.....	0,217 %

A mistura vitamínica, por nós preparada, apresentava a seguinte composição:

Tiamina.....	0,50 g
Riboflavina.....	0,50 g
Pantetonato de cálcio.....	2,00 g
Vitamina B12	3,00 mg
Vitamina B6	0,50 g
Colina	200,00 g
Vitamina A	500.000 U.I.
Vitamina D	50.000 U.I.
Vitamina E	5,00 g
Vitamina K	2,00 g
PABA	10,00 g
Niacina	5,00 g
Ácido fólico	0,20 g
Ácido ascórbico	100,00 g
Inositol	100,00 g
Biotina.....	1000,03 g
Sacarose q.s.p.....	1000,00 g

4.4.2 - Rações experimentais

A partir da ração de base preparamos as rações experimentais, adicionando as fontes protéicas às expensas do amido e da mistura salina, de forma a obter o nível desejado de proteína (10 ou 20%), e de minerais (4%).

Procuramos, desta forma, obter rações isonitrogenadas, isominerais, isocálcicas, isofosfatadas e isocalóricas, que foram fornecidas aos animais dos grupos (1) : (T₁, S₁, C₁) e dos grupos (2) : (T₂, S₂, C₂). As rações receberam a mesma designação do grupo respectivo.

Nas rações T e S, fornecidas aos animais dos grupos T e S, a mistura salina da ração de base foi eliminada, a fim de que os concentrados pudessem constituir única fonte de proteína, bem como de minerais.

O tratamento descrito encontra-se esquematizado no quadro I.

Como proteína padrão, usamos uma caseína alimentar contendo 80,0% de proteína, 5,3% de minerais, 11,2%

de unidade e 3,5% de lípidos e glícidos.

Q U A D R O I

Concentrado (Fonte protéica)	Grupo	Concen- trado adio. % %	Proteína na ração %	Mistura salina adio. %	Minerais na ração %
TILÁPIA	T	12,4	10	---	1,5
	T ₁	12,4	10	2,5	4,0
	T ₂	24,8	20	1,0	4,0
SARDINHA	S	11,6	10	---	1,2
	S ₁	11,6	10	2,8	4,0
	S ₂	23,2	20	1,6	4,0
CASEÍNA	C ₁	12,4	10	3,4	4,0
	C ₂	24,8	20	2,8	4,0

A análise das rações assim preparadas mostrou a composição apresentada na tabela 1.

TABELA Nº 1

COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES: RESULTADOS PERCENTUAIS (g/100g) OBTIDOS POR ANÁLISE

RAÇÃO	UNIDADE	PROTEÍNA	LÍPIDES	CINZA	FIBRA	* GLÍCIDES	CÁLCIO	FÓSFORO	** FLÚOR	CALORIAS por ccilulo
C ₁	9,21	9,68	8,11	3,45	0,96	68,59	1,011	0,627	2,72	396,3
C ₂	8,19	19,08	8,90	3,58	1,02	59,23	1,009	0,711	2,41	403,8
T	8,69	10,58	8,29	1,66	1,01	69,77	0,447	0,297	26,16	406,5
T ₁	8,57	9,60	8,85	3,70	0,93	68,38	1,046	0,601	27,73	402,0
T ₂	8,77	18,35	8,93	3,94	0,86	58,63	1,053	0,684	53,14	400,8
S	7,88	11,76	8,80	1,41	1,09	69,06	0,373	0,268	11,10	413,2
S ₁	8,82	10,05	7,54	3,56	0,94	69,09	0,995	0,634	10,71	394,6
S ₂	5,18	20,00	7,59	4,04	1,12	62,07	1,112	0,845	21,55	407,2

* Resultados obtidos por diferença

** Expresso em mg por quilo (ou ppm)

5 - MÉTODOS

5.1 - Preparo dos concentrados protéicos*

No preparo dos concentrados protéicos, procedemos à desidratação, desengorduramento e desodorização do material (peixe triturado), por extrações sucessivas com isopropanol, segundo o método preconizado pelo "Bureau of Commercial Fisheries" (99), segundo o esquema seguinte: cêrca de 20 quilos de peixe foram tratados com 30 litros de isopropanol a 91% , durante 12 horas, após o que a mistura foi agitada por uma hora e centrifugada. A torta foi, então, extraída com 15 litros de isopropanol a 91% , em aquecimento a 70° C , por uma hora, em recipiente com camisa de vapor e sob agitação. A seguir, a micela foi centrifugada, mantendo-se a temperatura. Nas duas extrações seguintes, utilizamos isopropanol a 99% à mesma temperatura, sendo que na terceira extração utilizamos doze litros e, na quarta, oito litros do álcool.

No preparo do concentrado de tilápia, os peixes foram divididos em três porções, sendo a extração praticada em contra-corrente. Os volumes de isopropanol foram ajustados em cada extração, a fim de manter as proporções já referidas.

.-.-.-.-.-

(*) Agradecemos à Cadeira de Tecnologia Geral e Químico-Farmacêutica a permissão do uso de seus aparelhos.

Após o processo de extração, as tortas obtidas foram aquecidas a 60°C durante 10 horas em corrente de ar e, finalmente, por mais 4 horas a 80°C. A seguir, o material foi pulverizado em moinho de bolas e tamizado em peneira (malha de 0,177 mm). O pó obtido constituiu-se no concentrado protéico que, após análise, foi utilizado para o preparo das rações.

5.2 - Preparo das rações

Após a mistura dos vários componentes, as rações foram transformadas em massa por meio de goma de amido. Fabricamos, então, um granulado vermicular, que foi dessecado a 40°C, em corrente de ar. Esta forma de apresentação da ração garante menor desperdício por parte do animal, diminuindo o erro no controle da quantidade ingerida. Além disso, permite melhor conservação e assegura homogeneidade no decorrer de toda a experiência | LAJOLO e col. (38) |.

5.3 - Avaliação do aproveitamento biológico

5.3.1 - Rações

Na avaliação do aproveitamento das rações preparadas, utilizamos, como índice, o coeficiente de eficácia alimentar (C.E.A.)*, que representa o aumento de peso do animal por grama de ração ingerida.

5.3.2 - Proteína

Para sua avaliação utilizamos:

a) coeficiente de eficácia protéica

.-.-.-.-

(*) Food Efficient Ratio (F.E.R.)

(C.E.P.)* , que representa o aumento de peso do animal por grama de proteína ingerida (segundo normas preconizadas pela A.O.A.C. (2)).

b) aproveitamento percentual do nitrogênio, ou seja, a percentagem de nitrogênio retida na carcaça do animal (obtida por análise), em relação ao nitrogênio total ingerido.

5.3.3 - Minerais

O aproveitamento dos minerais foi obtido pelo cálculo da percentagem retida na carcaça do animal, em relação ao total ingerido.

Tanto no caso do nitrogênio, como no dos minerais, o total retido pelo animal foi obtido da seguinte forma: quantidade total na carcaça (obtida por análise) após os 28 dias da experiência) menos a quantidade inicial (calculada pela análise da carcaça do grupo G⁰, e extrapolada segundo as diferenças de peso dos animais).

5.4 - Análise da carcaça

5.4.1 - Preparo do material para análise

Após os 28 dias da experiência, os animais foram sacrificados, sendo eliminados o estômago e os intestinos. A carcaça foi pesada, subdividida, dessecada em estufa a 105^o C e desengordurada. O material, seco e desengordurado, foi pulverizado em liquidificador e guardado para análise.

O grupo G⁰, sacrificado no tempo zero da experiência, após sofrer o mesmo tratamento, foi analisado. Os dados médios, obtidos pela análise da carcaça, serviram como controle inicial.

.-.-.-

(*) Protein Efficient Ratio (P.E.R.)

5.4.2 - Determinações

5.4.2.1 - Umidade

Dessecação em estufa regulada a 105°C , até pêsô constante.

5.4.2.2 - Extrato etéreo

Extração com éter etílico, em extrator contínuo de Soxhlet.

5.4.2.3 - Resíduo mineral fixo (cinza)

Incineração a 550°C até pêsô constante.

5.4.2.4 - Nitrogênio

Método de Kjeldahl, segundo técnica do Instituto Adolfo Lutz (82).

5.4.2.5 - Minerais (exceto flúor)

a) Cálcio: método colorimétrico de FERRO e HAM (22).

b) Fósforo: método de FISKE e SUBAROW (23).

c) Ferro: método que utiliza tiocianato, preconizado pelo Instituto Adolfo Lutz (82).

d) Sódio e potássio: fotometria de emissão de chama* . As soluções padrão foram preparadas de forma a conter quantidades idênticas às dos elementos maiores presentes nas soluções das amostras em análise.

5.4.2.6 - Determinação do flúor

O halogênio foi isolado do material sêco e desengordurado, utilizando-se o frasco preconizado por ZUCAS e LAJOLO (107). Na quantificação, usamos o método colorimétrico de MEGREGIAN (55).

.-.-.-

(*) Em fotômetro de chama marca Eletrosíntese

5.4.2.7 - Determinação dos aminoácidos*

O triptófano foi determinado quantitativamente, após hidrólise alcalina, pelo método proposto por MILLER (57). Os outros aminoácidos, após hidrólise em meio clorídrico 6N, foram analisados em analisador de aminoácidos, Modelo Beckman 120 C, com coluna de troca iônica.

5.5 - Análise estatística

Na comparação das médias dos resultados obtidos em cada grupo, valemo-nos do teste "t" de Student e Fisher. A significância foi testada ao nível de 5% (P 0,05). A fórmula utilizada foi a seguinte:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{\sum_i (x_{1i} - \bar{x}_1)^2 + \sum_i (x_{2i} - \bar{x}_2)^2}{N_1 + N_2 - 2} \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}}$$

Nas tabelas são apresentados os erros-padrão calculados segundo o proposto por MANTEL (51)

.....

(*) Realizada pelo Departamento de Bioquímica do Centro Tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos, Campinas, São Paulo.

6 - DADOS ANALÍTICOS

6.1 - Composição dos concentrados protéicos

As tabelas 2,3 e 4 mostram, respectivamente, a composição centesimal, o teor em aminoácidos essenciais e o teor de cálcio, fósforo, ferro, flúor, sódio e potássio dos concentrados protéicos obtidos a partir de Tilápia e de sardinha.

TABELA Nº 2

COMPOSIÇÃO MÉDIA CENTESIMAL DOS CONCENTRADOS
PROTÉICOS, RESULTADOS EXPRESSOS EM g/100g.

FRAÇÃO	CONCENTRADO	
	TILÁPIA	SARDINHA
umidade residual	6,43	3,40
proteína *	80,75	86,34
extrato etéreo	0,26	0,10
cinza	12,10	10,19
indeterminados por diferença	0,86	-

* N x 6,25

TABELA Nº 3

TEOR DE ALGUNS MINERAIS NOS CONCENTRADOS PROTÉI-
COS, RESULTADOS EXPRESSOS EM mg/100g.

MINERAL	CONCENTRADO	
	TILÁPIA	SARDINHA
Cálcio	3.154,0	2.866,0
Fósforo	2.412,0	1.918,0
Ferro	50,7	9,1
Flúor	22,9	8,2
Sódio	274,7	226,8
Potássio	649,8	612,5

TABELA Nº 4

COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS. RESULTADOS EXPRESSOS EM g/100g DE PROTEÍNA DO CONCENTRADO.

AMINOÁCIDO	C O N C E N T R A D O	
	TILÁPIA	SARDINHA
<i>Isoleucina</i>	4,705	3,733
<i>Leucina</i>	7,296	6,050
<i>Lisina</i>	8,810	7,753
<i>Fenilalanina</i>	3,973	3,448
<i>Tirosina</i> *	3,305	3,013
<i>1/2 cistina</i> *	1,045	1,974
<i>Metionina</i>	2,273	2,176
<i>Treonina</i>	4,528	3,581
<i>Triptofano</i>	1,560	1,569
<i>Valina</i>	4,390	4,708

* Aminoácido não considerado essencial.

6.2 - Curva de pêsos dos animais

O crescimento dos animais submetidos às rações experimentais, durante os 28 dias, está representado nos gráficos 1, 2 e 3. A curva de pêsos foi obtida a partir de 5 pontos, sendo o primeiro correspondente ao pêsos inicial e os seguintes às pesadas semanais.

As curvas foram agrupadas segundo a fonte protéica incluída na dieta, a saber: (nº 1) Caseína, (nº 2) Tilápia, (nº 3) Sardinha.

CURVAS DE PÊSO

GRÁFICO Nº1

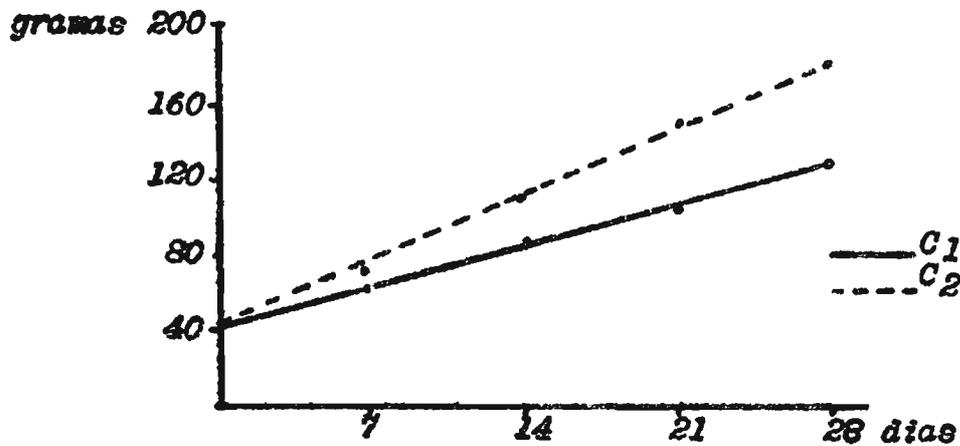


GRÁFICO Nº2

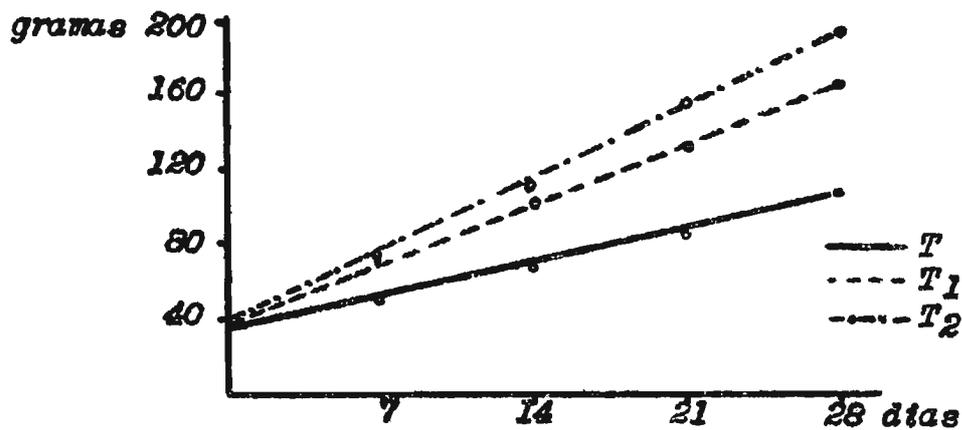
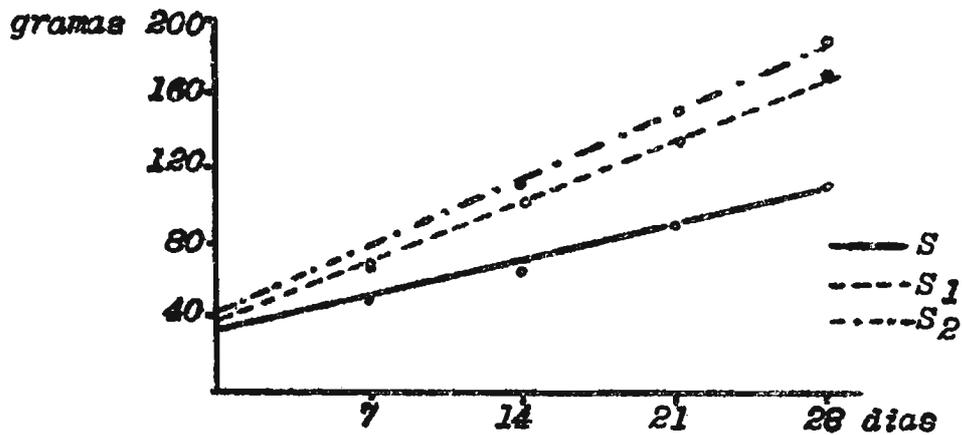


GRÁFICO Nº3



6.3 - Coeficiente de eficácia protéica e coeficiente de
eficácia alimentar

Os resultados referentes ao coeficiente de eficácia protéica, expressos através do ganho de peso e - calculados em índices, constam da tabela 5, que mostra também o peso inicial e final dos animais, bem como a quantidade de ração por eles ingerida durante a experiência.

TABELA Nº 5

AUMENTO DO PÊSO, CONSUMO DE RAÇÃO, C.E.A. e C.E.P.

Animais: Grupo	PÊSO (g)			RAÇÃO INGERIDA (g)	C.E.A.	PROTEÍNA INGERIDA (g)	C.E.P.
	INICIAL	FINAL	AUMENTO				
CASPIÑA	C1	40,6 +1,0	131,3 +4,6	90,8 +3,8	312,2 +8,9	0,291 +0,007	3,003 +0,076
	C2	41,0 +1,0	189,6 +4,5	148,6 +4,8	330,2 +2,9	0,450 +0,013	2,357 +0,068
TIAPIA	T	34,7 +0,7	106,3 +2,8	71,7 +2,3	251,1 +5,4	0,286 +0,010	2,703 +0,096
	T1	39,7 +1,60	165,8 +5,6	126,2 +6,0	350,7 +9,1	0,359 +0,008	3,736 +0,081
	T2	40,8 +1,2	195,8 +7,2	155,0 +6,0	371,3 +11,0	0,417 +0,005	2,273 +0,02
SARDINHA	S	34,8 +0,7	110,9 +3,7	76,10 +3,33	247,9 +6,3	0,307 +0,005	2,607 +0,048
	S1	41,6 +1,3	172,8 +6,7	131,2 +5,4	365,9 +9,9	0,358 +0,007	3,567 +0,007
	S2	41,4 +1,3	188,2 +3,8	148,4 +4,3	357,2 +4,1	0,415 +0,009	2,074 +0,045

6.4 - Resultados obtidos pela análise das carcaças

6.4.1 - Pêso e composição centesimal das carcaças

a) *Animais de experiência* - As carcaças dos animais de experiência, analisadas quanto ao pêso e composição centesimal, após os 28 dias, mostraram os resultados médios que se encontram na tabela 6. (página seguinte)

b) *Animais do grupo G⁰* - Na tabela 7, encontram-se os resultados da análise da carcaça dos animais do grupo sacrificado ao início da experiência (G⁰). Estes resultados foram utilizados, por extrapolação, para calcular o nitrogênio, cálcio e flúor iniciais dos animais em experiência. Em todas as tabelas, quando nos referimos a resultado "inicial", referimo-nos a estes dados.

Na tabela 5 encontra-se, também, o pêso médio dos animais e da carcaça do mesmo grupo (G⁰).

TABELA Nº 7

Animais:	PERCENTAGEM				PÊSO (g)	
	N	Ca	P	F*	Animais	Carcaça**
G ⁰	10,47 ±0,06	3,70 ±0,10	2,80 ±0,09	3,06 ±0,31	38,0 ±0,43	7,84 ±0,15

(*) Expresso em ppm (partes por milhão)

(**) Sêca e desengordurada

TABELA Nº 6

PÊSO E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS CARÇAÇAS.

Animais:	P Ê S O (g)		COMPOSIÇÃO CENTESIMAL						
	INTEGRAL	SÊCA/DESCO	UMIDADE	LÍPIDES	PROTEÍNA	MINERAIS	INDETERM.*		
CASERNA	C 1	118,60 +4,47	29,09 +0,99	65,03 +0,79	10,42 +0,10	17,88 +0,16	3,30 +0,08	3,37	
	C 2	174,41 +4,44	44,75 +0,91	66,25 +0,48	8,08 +0,58	17,55 +0,13	2,98 +0,03	5,14	
TILAPIA	T	95,58 +2,23	24,72 +0,36	65,74 +1,17	8,37 +0,81	20,24 +0,26	8,23 +0,07	2,42	
	T 1	150,23 +5,14	36,69 +0,97	64,35 +0,56	11,19 +0,94	18,12 +0,23	2,94 +0,06	3,40	
	T 2	179,27 +6,80	46,02 +1,83	66,81 +0,45	7,52 +0,52	19,41 +0,11	3,01 +0,03	3,25	
SARDINHA	S	100,70 +2,94	25,82 +0,38	67,04 +0,62	7,33 +1,30	18,87 +0,18	3,22 +0,07	3,54	
	S 1	157,83 +6,76	37,88 +1,54	65,32 +0,74	10,66 +0,88	17,29 +0,30	3,07 +0,04	3,66	
	S 2	172,11 +3,46	43,94 +0,73	66,27 +0,67	8,20 +0,45	18,45 +0,31	3,15 +0,13	3,93	

* Resultado obtido por diferença.

6.4.2 - Aproveitamento percentual do nitrogênio ingerido.

Na tabela nº 8, encontramos os seguintes dados:

- a) Nitrogênio inicial (obtido segundo foi descrito em 6.4.1 b)
- b) Nitrogênio total na carcaça após o término da experiência.
- c) Nitrogênio fixado.
- d) Concentração de nitrogênio na carcaça dos animais.
- e) Aproveitamento percentual a partir do nitrogênio ingerido.

TABELA Nº 8

CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO NA CARCAÇA SÊCA E DESENGORDURADA, TOTAL FIXADO E APROVEITAMENTO PERCENTUAL

Animaes Grupo	NITROGÊNIO						APROVEI- TAMENTO (%)
	INIÇIAL (g)	CARCAÇA (%)	TOTAL (g)	FIXADO (g)	INGERIDO (g)		
C1	0,886	11,57	3,365	2,480	4,834	51,29	
	+0,018	+0,20	+0,123	+0,105	+0,138	+2,00	
C2	0,895	10,93	4,892	3,997	10,083	39,69	
	+0,022	+0,03	+0,103	+0,106	+0,089	+1,00	
T	0,757	12,52	3,095	2,338	4,251	55,06	
	+0,014	+0,19	+0,088	+0,080	+0,091	+1,27	
T1	0,866	11,85	4,348	3,482	5,391	64,57	
	+0,032	+0,07	+0,105	+0,112	+0,139	+0,66	
T2	0,891	12,10	5,569	4,678	10,900	42,86	
	+0,032	+0,05	+0,224	+0,160	+0,323	+0,55	
S	0,760	11,79	3,043	2,283	4,663	48,99	
	+0,014	+0,08	+0,060	+0,050	+0,119	+0,82	
S1	0,907	11,51	4,361	3,453	5,887	58,58	
	+0,029	+0,04	+0,184	+0,119	+0,159	+1,03	
S2	0,904	11,58	5,084	4,177	11,429	36,55	
	+0,031	+0,15	+0,070	+0,043	+0,133	+0,31	

6.4.3 - Aproveitamento percentual do cálcio, do fósforo e do flúor ingeridos.

Nas tabelas 9, 10 e 11 encontram-se os seguintes dados, respectivamente relacionados ao cálcio, fósforo e flúor:

- 1 - quantidade inicial (obtida segundo foi descrito em 6.4.1 b).
- 2 - quantidade total na carcaça após o término da experiência.
- 3 - quantidade fixada.
- 4 - concentração do mineral na carcaça.
- 5 - aproveitamento percentual a partir do ingerido.

TABELA Nº 9

CONCENTRAÇÃO DO CÁLCIO NA CARCAÇA SÊCA E DESENGORDURADA, TOTAL FIXADO E APROVEITAMENTO PERCENTUAL

Animais:	CÁLCIO							APROVEITAMENTO (%)
	GRUPO	INICIAL (g)	TOTAL (g)	FIXADO (g)	CARCAÇA (%)	INGERIDO (g)		
CASEIJA	C 1	0,314 ±0,008	1,080 ±0,026	0,766 ±0,024	3,72 ±0,110	3,157 ±0,090	24,35 ±0,93	
	C 2	0,317 ±0,008	1,379 ±0,025	1,062 ±0,024	3,08 ±0,05	3,331 ±0,029	31,89 ±0,66	
TIAPIA	T	0,268 ±0,005	0,842 ±0,022	0,574 ±0,017	3,41 ±0,06	1,122 ±0,024	51,15 ±0,78	
	T 1	0,307 ±0,012	1,181 ±0,028	0,874 ±0,030	3,22 ±0,06	3,669 ±0,095	23,83 ±0,44	
	T 2	0,316 ±0,011	1,345 ±0,044	1,030 ±0,035	2,93 ±0,05	3,909 ±0,116	26,34 ±0,40	
SARDINHA	S	0,269 ±0,006	0,850 ±0,014	0,581 ±0,013	3,30 ±0,06	0,924 ±0,023	63,05 ±2,39	
	S 1	0,322 ±0,010	1,253 ±0,038	0,931 ±0,028	3,31 ±0,05	3,641 ±0,098	25,58 ±0,20	
	S 2	0,321 ±0,011	1,436 ±0,055	1,115 ±0,044	3,26 ±0,07	3,972 ±0,044	28,06 ±1,34	

TABELA Nº 10

CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO NA CARCAÇA SÊCA E DESENGORDURADA, TOTAL FIXADO E APROVEITAMENTO PERCENTUAL

Animais: Grupo	FÓSFORO						APROVEITAMENTO (%)
	INICIAL (g)	TOTAL (g)	FIXADO (g)	CARCAÇA (%)	INGERIDO (g)		
CASEIHA	C 1	0,236 ±0,006	0,799 ±0,023	0,563 ±0,021	2,75 ±0,04	1,958 ±0,056	28,80 ±1,35
	C 2	0,239 ±0,006	1,066 ±0,017	0,827 ±0,014	2,38 ±0,021	2,347 ±0,021	35,24 ±0,55
TIPIPIA	T	0,202 ±0,004	0,684 ±0,021	0,482 ±0,017	2,77 ±0,06	0,746 ±0,016	64,70 ±1,98
	T 1	0,231 ±0,009	0,953 ±0,022	0,722 ±0,019	2,60 ±0,04	2,113 ±0,054	34,19 ±0,58
	T 2	0,238 ±0,009	1,136 ±0,044	0,898 ±0,038	2,47 ±0,02	2,539 ±0,075	35,32 ±0,50
	S	0,203 ±0,004	0,694 ±0,078	0,491 ±0,009	2,69 ±0,00	0,666 ±0,015	73,86 ±1,22
SARDINHA	S 1	0,242 ±0,009	0,994 ±0,031	0,752 ±0,019	2,63 ±0,04	2,320 ±0,063	32,42 ±0,57
	S 2	0,241 ±0,009	1,162 ±0,035	0,920 ±0,027	2,64 ±0,04	3,018 ±0,035	30,36 ±1,09

TABELA Nº 11

CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR NA CARÇAÇA SÊCA E DESENGORDURADA, TOTAL FIXADO E APROVEITAMENTO PERCENTUAL

Anima:is: G R U P O	F L Ú O R							APROVEITAMENTO (%)
	INICIAL (mg)	TOTAL (mg)	FIXADO (mg)	CARÇAÇA (ppm)	INGERIDO (mg)			
C A S E I N H A	C 1	26,1 +0,6	0,207 +0,013	0,181 +0,013	7,15 +0,54	0,851 +0,024	21,23 +1,35	
	C 2	26,3 +0,6	0,144 +0,013	0,118 +0,13	3,34 +0,32	0,797 +0,007	14,76 +1,61	
T R I A P I A	T	22,2 +0,4	2,997 +0,084	2,968 +0,084	121,27 +2,88	6,568 +0,137	45,31 +1,044	
	T 1	25,4 +0,9	2,004 +0,097	1,978 +0,096	54,66 +2,44	9,726 +0,252	20,38 +1,14	
	T 2	26,2 +0,9	3,741 +0,105	3,714 +0,098	81,48 +2,19	19,560 +0,584	18,99 +0,36	
	S	22,3 +0,4	1,477 +0,045	1,455 +0,044	57,23 +1,81	2,752 +0,070	52,92 +1,84	
S A R D I N H A	S 1	26,7 +0,8	0,894 +0,034	0,868 +0,037	23,67 +0,96	3,918 +0,106	22,17 +0,86	
	S 2	26,6 +0,9	1,598 +0,032	1,572 +0,031	36,41 +0,58	7,697 +0,090	20,44 +0,58	

6.5 - Tabela Geral

Para permitir melhor comparação dos dados obtidos, reunimos na tabela 12 as informações relativas ao Coeficiente de Eficácia Alimentar e Protéica, bem como o aproveitamento percentual do nitrogênio, cálcio, fósforo e flúor ingeridos.

TABELA Nº 12

TABELA GERAL: C.E.A., C.E.P. e APROVEITAMENTO PERCENTUAL DO NITROGÊNIO, CÁLCIO, FÓSFORO E FLÚOR

Anima is: Grupo	C.E.A.	C.E.P.	APROVEITAMENTO PERCENTUAL				
			NITROGÊNIO	CÁLCIO	FÓSFORO	FLÚOR	
CASAÍNA	C 1	0,291 ±0,007	3,003 ±0,076	51,29 ±2,00	24,35 ±0,93	28,80 ±1,35	21,23 ±1,35
	C 2	0,450 ±0,013	2,357 ±0,068	39,69 ±1,00	31,89 ±0,66	35,24 ±0,55	14,76 ±1,61
TIPIPIA	T	0,286 ±0,010	2,703 ±0,096	55,06 ±1,27	51,15 ±0,78	64,70 ±1,98	45,31 ±1,04
	T 1	0,359 ±0,008	3,736 ±0,081	64,57 ±0,66	23,83 ±0,44	34,19 ±0,58	20,38 ±1,14
	T 2	0,417 ±0,005	2,273 ±0,02	42,86 ±0,55	26,34 ±0,40	35,32 ±0,50	18,99 ±0,36
	S	0,307 ±0,005	2,607 ±0,048	48,99 ±0,82	63,05 ±2,39	73,86 ±1,22	52,92 ±1,84
SARDINHA	S 1	0,358 ±0,007	3,567 ±0,007	58,58 ±1,03	25,58 ±0,20	32,42 ±0,57	22,17 ±0,86
	S 2	0,415 ±0,009	2,074 ±0,045	36,55 ±0,31	28,06 ±1,34	30,36 ±1,09	20,44 ±0,58

7 - ANÁLISE DOS DADOS

7.1 - Concentrados protéicos

A composição centesimal média dos concentrados mostra a grande riqueza do produto em proteína e minerais, particularmente cálcio, fósforo e flúor (tabelas 2 e 3); sua fração protéica possui todos os aminoácidos considerados essenciais ao organismo humano (tabela 4)

7.2 - Coeficiente de Eficácia Alimentar (C.E.A.) e Coeficiente de Eficácia Protéica (C.E.P.).

A comparação, através da análise estatística dos resultados dos grupos T_1, S_1, C_1 , mostrou haver diferença significativa no consumo de ração, aumento de peso, C.E.P. e C.E.A. entre os grupos T_1 e C_1 ; S_1 e C_1 . Não foi, porém, significativa entre os grupos T_1 e S_1 .

A comparação entre os grupos T_2, S_2 e C_2 - mostrou significância, para o C.E.P., nas diferenças entre os grupos T_2 e S_2 ; S_2 e C_2 ; para o C.E.A., entre os grupos T_2 e C_2 ; S_2 e C_2 ; não havendo, porém, diferenças quanto ao aumento de peso. O consumo de ração foi diferente entre os grupos T_2 e C_2 ; S_2 e C_2 .

A comparação entre os grupos T_1 e T_2 ; S_1 e S_2 , mostrou haver diferença significativa no consumo de ração, -

aumento de peso, C.E.P. e C.E.A. Estas diferenças, entretanto, não se manifestaram entre os grupos T e S.

Os grupos submetidos às rações (2) (20% de proteína) mostraram aumento de peso e C.E.A. significativamente superiores aos obtidos para os grupos correspondentes, submetidos às rações (1) (10% de proteína). Entre os grupos (1) e (2) não houve diferença significativa no consumo de ração.

7.3 - Aproveitamento percentual do nitrogênio ingerido

A análise estatística do aproveitamento do nitrogênio revelou, por comparação dos valores obtidos para os grupos (1) entre si e (2) entre si, bem como entre T_1 e T_2 ; T_1 e S_1 ; S_1 e S_2 , serem significantes as diferenças observadas.

7.4 - Aproveitamento percentual do cálcio ingerido

A análise estatística do aproveitamento do cálcio nos grupos (1) mostrou ser significativa a diferença entre os grupos T_1 e S_1 , não o sendo entre os grupos T_1 e C_1 nem entre os S_1 e C_1 .

Nos grupos (2), foram significativas as diferenças encontradas entre os grupos T_2 e C_2 , bem como S_2 e C_2 , não o sendo nas encontradas entre T_2 e S_2 .

7.5 - Aproveitamento percentual do fósforo ingerido

A análise estatística mostrou ser diferente o aproveitamento do fósforo nos grupos (1).

Nos grupos (2) foram significativas as diferenças entre os grupos T_2 e S_2 ; S_2 e C_2 .

A comparação dos grupos T e T_1 ; S e S_1 , - bem como T e S mostrou serem significativas as diferenças observadas.

7.6 - Aproveitamento percentual do flúor ingerido

A análise estatística mostrou que as diferenças obtidas entre os grupos T_1 e T , S_1 e S (submetidos a diferentes concentrações de minerais na dieta), foram significativas, o mesmo ocorrendo entre os grupos S e T .

Os grupos submetidos às rações isominerais mostraram ser significativa apenas a diferença observada entre o aproveitamento do flúor pelos grupos T_2 e S_2 , T_2 e S_1 .

A concentração do flúor na carcaça e o total fixado, foram diferentes estatisticamente, em todos os grupos, com exceção da diferença observada na concentração do halogênio entre os grupos T_1 e S .

8 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

8.1 - Os concentrados

As variações de componentes, observadas nos concentrados de tilápia e de sardinha, mostram alguns aspectos interessantes. Assim, por exemplo, o maior teor de "cinza" no concentrado de tilápia pode ser explicado pela maior percentagem de ossos na matéria-prima empregada, fato já referido por POWER (78). Essa variação pode ser também interpretada como resultado da maior fragmentação dessas estruturas antes da extração ou durante a pulverização do material seco | BROWN e col.(5) , DE e HANNAM (9) |. A riqueza em cálcio e fósforo decorre, por consequência, da proporção de ossos e escamas presentes no pó final obtido.

A observação desses fatos é importante, porque sugere a possibilidade de se obterem produtos com maior ou menor teor de um dos componentes, tendo sido, mesmo, a solução proposta por BROWN e col.(5) para diminuir o teor de flúor de concentrados preparados com peixes inteiros*.

O baixo teor de umidade e de extrato etéreo indica a possibilidade de boa conservação do produto, qua-

•-•-•-•-

(*) Para atender à exigência do F.D.A. americano.

lidade particularmente importante em países que apresentam condições climáticas desfavoráveis.

Com relação ao flúor, notamos ser o concentrado de tilápia muito mais rico que o de sardinha. Neste caso, porém, a diferença não parece devida, apenas, à maior percentagem de ossos e escamas no produto, mas, também, à diferente concentração do halogênio nos dois peixes.

Análises realizadas em nosso laboratório denunciaram concentrações de flúor de até 2300 e 1300 ppm, respectivamente, em ossos e escamas de tilápia, e de 426 e 76 ppm nas mesmas estruturas de sardinhas. Verificamos, também, que a tilápia, desde a fase de alevino (e a partir daí, sempre de forma crescente*), possui elevado teor do halogênio, superior ao de outros peixes que vivem no mesmo ambiente, como o corimbata e o black-bass.

Os fatos acima referidos indicam que o teor de flúor nos concentrados não pode ser considerado em valores absolutos: OLIVEIRA (73), por exemplo, encontrou, em farinhas de sardinha de consumo animal, concentrações de flúor de 50 a 80 ppm, em função da época do ano. Nós mesmos, em experiências prévias, obtivemos concentrados de tilápia com 400 ppm e de sardinha com 130 ppm.

O concentrado de tilápia apresenta elevado teor de ferro, superior aos valores médios de concentrados de outros peixes, fato ilustrado pelo quadro II.

QUADRO II

<u>CONCENTRADO</u>	<u>FERRO</u> (mg/100g de cinza)
Tilápia	421
Sardinha	90
F.I.R.I. (15)	296
Viobin (15)	287
Bureau of Commercial Fisheries (98)	140

o--.-o--.-

(*) Dados obtidos em nosso laboratório

Os produtos por nós obtidos mostram a composição exigida pela legislação mais recente, que é a do F.D. A. (98), para esse tipo de alimento; apenas o teor do flúor - do nosso concentrado foi superior a 100 ppm, máximo permitido.

Visando conhecer a composição da fração protéica dos concentrados, facilitar estudos posteriores relativos ao uso do produto na suplementação de proteínas deficientes, verificar se houve efeito prejudicial ao produto durante o processamento, determinamos os seus aminoácidos essenciais.

O quadro III inclui, para fins de comparação, os aminogramas obtidos por nós e por outros autores. O resultado fornecido pela F.A.O. é o da média de 38 diferentes - amostras de farinhas de peixes.

QUADRO III

Aminoácido m/g16g/N	C O N C E N T R A D O				<i>Clupea longiceps</i> (33)
	<i>Tilápia</i>	<i>Sardinha</i>	<i>Urophycis chuss (99)</i>	F.A.O. (19)	
<i>Isoleucina</i>	4,705	3,733	4,56	4,293	5,23
<i>Leucina</i>	7,296	6,050	7,78	7,214	8,29
<i>Lisina</i>	8,810	7,753	8,41	7,724	9,66
<i>Fenilalanina</i>	3,978	3,448	4,24	3,762	3,98
<i>Tirosina</i>	3,305	3,014	3,35	3,080	-
<i>Cistina</i>	1,045	0,576	0,77**	1,229	-
<i>Metionina</i>	2,273	2,176	3,30	2,729	3,25
<i>Treonina</i>	4,528	3,581	4,47	4,229	5,85
<i>Triptófano</i>	1,560*	1,569*	1,03	0,957**	1,13
<i>Valina</i>	4,390	4,708	5,26	5,075	7,16
Método	Cromatográfico				Microbiológico

(*) Doseamento por método químico

(**) Doseamento microbiológico

Os concentrados de tilápia e de sardinha possuem todos os aminoácidos essenciais, sendo que o conteúdo total deste é superior no primeiro.

O nosso concentrado de sardinha mostra resultados inferiores aos obtidos por KADKOL e LAHIRI (33), mas é preciso notar: 1º) que os peixes pertencem a espécies diferentes; 2º) que o processo de análise usado por aqueles autores foi microbiológico e o nosso cromatográfico.

O conteúdo, em triptófano, de nossos concentrados mostra-se, à primeira vista, superior (50%) ao dos outros, ao passo que o teor de aminoácidos sulfurados, especialmente o de cistina, revela-se inferior no produto obtido da sardinha.

Conhecida a labilidade térmica dos aminoácidos sulfurados [DONOSO e col.(13), SAMBUCETTI e SANAHUJA (81)] e visto que os peixes frescos [FAO (19), FERREIRA e GRAÇA (21)] apresentam maior teor destes aminoácidos, parece-nos lícito supor que o aquecimento tenha provocado alguma destruição dos mesmos em nossos produtos.

Sabendo que o valor biológico de uma proteína está, entre outros fatores, na dependência do equilíbrio entre os teores dos diversos aminoácidos essenciais, calculamos seu cômputo protéico segundo o proposto F.A.O. (20). Essa operação visou estabelecer a existência de um possível fator limitante e obter uma indicação aproximada do valor biológico da proteína dos concentrados de tilápia e de sardinha.

No Quadro IV, apresentamos os valores obtidos, tomando como referência a proteína do ovo e usando, para o cálculo, os valores do aminograma do ovo e da caseína, encontrados na literatura [F.A.O. (19)(20)]. Os aminoácidos, para cada proteína, estão expressos em mg/g de nitrogênio e em porcentagem.

QUADRO IV

	Tilápia		Sardinha		Caseína		Ovo	
	mg/gN	%	mg/gN	%	mg/gN	%	mg/gN	%
Isoleucina	294	11.20	233	10.18	345	10.76	415	12.91
Leucina	456	17.40	378	16.53	607	18.93	553	17.20
Lisina	551	21.04	485	21.20	518	16.16	403	12.40
Fenilalanina	249	9.52	215	9.40	334	10.42	365	11.35
Tirosina	206	7.83	189	8.26	371	11.57	262	8.15
Aromáticos	455	17.33	404	17.64	705	21.99	627	19.50
Cistina	65	2.48	36	1.57	23	0.72	149	4.63
Metionina	143	5.46	136	5.94	178	5.55	197	6.13
Sulfurados	208	7.94	174	7.51	201	6.27	346	10.76
Treonina	283	10.81	223	9.75	297	9.26	317	9.86
Triptofano	98	3.75	99	4.32	103	3.21	100	3.10
Valina	275	10.50	294	12.84	430	13.41	454	14.12
Total	2.620	100,00	2.288	100,00	3.206	100,00	3.215	100,00
Cômputo Proteico	74		69		58		100	

Como se pode observar pelo quadro acima, a percentagem dos aminoácidos sulfurados nos concentrados é inferior à da proteína-padrão escolhida, constituindo-se, portanto, no fator limitante principal.

A existência de um fator limitante representado pelo baixo teor de aminoácidos sulfurados não nos surpreendeu, pois o fato já fôra verificado por outros autores | MORRISON & Mc LAUGHAN (62), MORRISON & SABRY (64), STILLING & Col. (94), YANEZ & DONOSO (102) e YANEZ e Col. (103) |.

Como o cômputo protéico guarda relação com a utilização protéica líquida da proteína | F.A.O. (20) |, podemos dizer, com base no cômputo obtido para os nossos concentrados, que

a proteína do concentrado de tilápia deverá ser superior à da sardinha e, ambas, melhores do que a caseína.

O quadro IV mostra, também, o excesso de lisina em relação à proteína-padrão considerada. Este fato é particularmente importante, se pensarmos no uso dos concentrados para suplementação de farinhas de cereais, cuja proteína é deficiente nesse aminoácido.

Se bem que o estudo da composição química dos alimentos represente valioso recurso para a indicação de seu valor alimentar, êle não dispensa os ensaios biológicos para conclusões definitivas sôbre o assunto. Portanto, com o intuito de obter conhecimentos mais seguros sôbre o valor biológico dos concentrados protéicos de tilápia e de sardinha, procuramos verificar a utilização das suas proteínas por animais jovens.

8.2 - Ensaios biológicos

8.2.1 - C.E.A., C.E.P. e aproveitamento percentual do nitrogênio.

Como se verifica pela curva do pêso (vide página 30), o crescimento dos animais, durante a experiência, foi normal, comparável ao de animais da mesma idade. Verificou-se, também, crescimento mais acentuado dos animais alimentados com as rações mais ricas em proteína (20%) e, ao nível de 10%, naqueles que receberam, nas rações, suplementação mineral.

É sabido que animais alimentados com rações que possuem 20% de proteína tendem a ganhar mais pêso e, em função disso, passam a ter aumentadas as necessidades calóricas, ingerindo mais ração. Daí resulta, também, um maior coeficiente de eficácia alimentar, se relacionado a rações contendo níveis de apenas 10% de proteína.

Como já foi descrito na análise dos dados (vide página 43), o aumento de pêso e o C.E.A. dos animais alimentados com as rações (2) foram significativamente superiores aos dos alimentados com as rações (1), como era de se esperar. Quanto ao consumo de ração, há, nos grupos T₂ e C₂ uma tendência -

(não significativa) a um maior consumo. No grupo S_2 , em relação a S_1 , inversamente, a tendência é para um consumo menor; êste, porém, não sendo estatisticamente significativo, não pode ser atribuído a nenhuma causa específica.

Concentrados de Urophycis chuss, preparados pelo processo por nós utilizado, sendo testados exaustivamente, não mostraram toxicidade [Bureau of Commercial Fisheries (99)]; - também no caso dos concentrados de tilápia e de sardinha, a adição de 25% de concentrados à ração não causou fenômenos perceptíveis de caráter tóxico.

Para determinar a superioridade ou não de um concentrado sobre o outro (tilápia e sardinha), e de ambos sobre a caseína, comparamos o crescimento dos animais segundo o nível de proteína recebido na dieta.

Como é sabido, a maior ingestão de rações contendo níveis baixos de proteína de boa qualidade e balanceadas caloricamente, corresponde maior aumento de peso e maior C.E.A.

Comparando os animais do grupo (1) entre si, vemos que o consumo de ração do grupo T_1 foi maior do que S_1 ($P < 0,01$), e ambos superiores ao do grupo C_1 , tendo-se verificado, em correspondência, que o C.E.A. dos animais alimentados com os concentrados era superior ao dos animais alimentados com a caseína, o mesmo acontecendo com o peso da carcaça seca e desengordurada ($P < 0,01$). Tal fato indica a superioridade dos concentrados sobre a caseína, não se evidenciando, porém, superioridade de um sobre outro.

Comparando os mesmos índices com as rações contendo 20% de proteína, apesar de os ratos submetidos às dietas de caseína ingerirem menos ração ($P < 0,01$) do que os que a recebiam com os concentrados, não se verificou diferença significativa no peso da carcaça seca e desengordurada. O C.E.A., porém, foi superior para a ração contendo caseína. Uma vez que as rações eram isocalóricas, êsse fato nos faz pensar numa maior deposição de lípidos na carcaça dos animais do grupo C_2 , devido à maior eficiência calórica dessa ração. Entretanto, a análise dos lípidos da carcaça dêstes animais, não permitiu conclusões sobre o fato.

A determinação do crescimento do animal e

do C.E.A. possibilita o estabelecimento de uma perspectiva global sobre o valor do alimento, enquanto o C.E.P. é um índice - diretamente relacionado à qualidade da proteína.

O C.E.P., medido ao nível de 10% de proteína na ração, nas rações balanceadas, mostrou serem as proteínas dos concentrados de qualidade superior à da caseína ($P < 0.01$), resultado que concorda com o obtido para o C.E.A. Não foi, porém, evidenciada, superioridade significativa de um concentrado sobre outro, ao nível estatístico registrado.

No Quadro V, comparamos os resultados obtidos pelos nossos concentrados aos dos melhores produtos obtidos e testados em outros países (página seguinte)

Verifica-se, pelo quadro, que os produtos por nós obtidos comparam-se, favoravelmente, aos de outros países e, também, que a caseína por nós utilizada como padrão é de boa qualidade, comparável à usada por outros autores. Estes resultados estão, também, de acordo com o exigido pela legislação americana para o valor biológico da proteína de concentrados de peixe.

Comparando as rações (1) e (2), observamos que, ao contrário do que se passa com o C.E.A., o C.E.P. diminui com o aumento do teor de proteína na ração. Isto confirma a mesma observação de outros autores que usaram concentrados protéicos de peixe [MORRISON & CAMPBELL (61), MORRISON e Col. (65)] e caseína [MORRISON & CAMPBELL (61)].

Como a medida do valor biológico de uma proteína pelo C.E.P. baseia-se apenas no aumento de peso, também determinamos a retenção de nitrogênio pelo animal, a partir do ingerido. Para este fim, o exame da carcaça pode dar informações sobre a utilização protéica líquida aparente. Aparente, pois a retenção de nitrogênio foi estabelecida pela diferença entre o nitrogênio final e o inicial obtido do G^0 , e não entre o nitrogênio final e o da carcaça de animais mantidos sob dieta aprotéica, normalmente usada para a determinação da utilização protéica líquida [MILLER & BENDER (58)].

Os valores obtidos para o aproveitamento do nitrogênio, comparados aos do cômputo protéico, confirmam as indicações fornecidas pela análise dos aminoácidos.

No quadro seis (VI), estão representados os valores do cômputo e do aproveitamento do nitrogênio, calculados em relação à caseína fixada como 100, ilustrando a cor -

QUADRO V

54

SOLVENTE - PROCESSO	PEIXE UTILIZADO	C. E. P.			REFER.
		CONCENTRADO		CASEÍNA	
		OBTIDO	AJUSTADO		
ISOPROPANOL (99)	<u>Sardinella aurita</u>	3,567	2,97	3,003	
	<u>Tilapia melanopleura</u>	3,736	3,11	3,003	
	<u>Urophycis chuss</u>	3,24	2,70	3,00	(99)
ISOPROPANOL (79)	<u>Bacalhau (integral)</u>	2,75	2,64	2,60	(78)
	<u>Descabeçado e Esvoaçado</u>	2,68	2,58	2,60	
	<u>File'</u>	3,09	2,97	2,60	
	<u>Bacalhau :File'</u>	3,07	3,07	2,50	(29)
	<u>Bacalhau :File'</u>	3,80	3,12	3,04	(61)
	<u>Arenque</u>	3,21	3,09	2,60	(78)
ISOPROPANOL (25)	<u>Bacalhau (resid.)</u>	3,01	2,58	2,88	(62)
	<u>Arenque (resid.)</u>	3,23	2,76	2,88	
ETANOL (37)	<u>Cámea Longioera</u>	2,92	2,40	3,04	(87)
ETANOL (103)	<u>Merluccius aui</u>	2,74	2,74	2,50	(29)
1,2-DICLOROETANO	_____	3,20	_____	_____	(24)
	_____	2,63	2,48	2,65	(32)
	<u>Sardinha</u>	2,70	2,55	2,75	
2- BUTANOL	"Menhadem"	3,05	2,59	2,92	(62)
1,2-Dicloroetano-Viobin	<u>Mist.de vários</u>	2,51	2,13	2,92	

Valores ajustados para caseína = 2,50

respon^{ção} existente. Isto confirma a superioridade dos concentrados sôbre a caseína e permite considerarmos o concentrado de tilápia superior ao da sardinha, superioridade que o C.E.P. não evidenciara.

QUADRO VI

MÉTOD	FONTE PROTÉICA		
	CASEÍNA	SARDINHA	TILÁPIA
CÔMPUTO PROTÉICO	100	119	127
APROVEITAMENTO % do N*	100	114	126

* Para 10% de proteína na ração.

Devemos salientar, ainda, a importância - que o nível de proteína na ração e o método utilizado assumem - na avaliação do valor biológico dos concentrados, evidente pelos resultados obtidos para o C.E.P., e aproveitamento do Nitrogênio nos vários grupos experimentais.

8.2.2 - Aproveitamento dos minerais

Paralelamente ao conhecimento do valor biológico da proteína dos concentrados, procuramos obter informações sôbre a eficácia dos minerais na manutenção do crescimento e, especialmente, a utilização do cálcio, fósforo e flúor - particularmente dêste último, pela ambivalência de seus efeitos.

Com essa finalidade, obtivemos os mesmos índices (C.E.A., C.E.P.) já discutidos, com animais submetidos a rações sem suplementação de mistura salina, sendo os concentrados, portanto, a única fonte de proteínas e minerais.

O baixo teor de minerais - aquém do ótimo - presente na ração, permitiu avaliar a possibilidade de seu aproveitamento e a constatação de suas possíveis deficiências qualitativas e quantitativas, às vêzes não evidenciáveis nas concentrações normalmente utilizadas.

Comparados os efeitos das rações T e S com as correspondentes T₁ e S₁, verificamos que o aumento de peso, -

consumo de ração e pêso da carcaça sêca e desengordurada foram significativamente inferiores ($P < 0,01$) nas rações não suplementadas. O mesmo aconteceu com relação ao C.E.P., C.E.A. e retenção do nitrogênio ($P < 0,01$).

Tais resultados falam em favor de uma deficiência quantitativa de um ou mais minerais, ou de sua deficiente utilização pelo organismo.

JAFFÉ (32) e SURE (97) não notaram deficiências minerais nos concentrados por êles analisados. O primeiro, porém, forneceu aos ratos misturas de milho moído (80%), com concentrado da Viobin (20%) - maior teor mineral, portanto, do que em nosso caso. Além disso, JAFFÉ não determinou o teor dos minerais do milho e do concentrado; o crescimento dos animais foi comparado ao de outros alimentados com ração comercial (Purina). Outrossim, não forneceu informações sôbre o peixe empregado.

SURE (97), estudando dois produtos (Chile no e da Viobin), também não percebeu deficiências minerais evidenciadas pela comparação do crescimento de animais alimentados com caseína e mistura salina de boa qualidade, com os alimentados com as rações balanceadas em que o teor de minerais era de 4%.

Em ambos os casos, é possível que alguma deficiência possa não ter sido evidenciada, devido ao elevado teor de minerais da ração.

A análise dos dados obtidos a propósito do aproveitamento do cálcio e do fósforo mostra que a menor teor dêesses minerais na ração corresponde maior retenção percentual em relação ao ingerido. Isto é de se esperar, em se tratando de boas fontes, sugerindo uma boa absorção dos mesmos. Similarmente, os animais alimentados com a ração S mostraram retenção maior do que os que ingeriram a ração T ($P < 0,01$).

A fonte mineral, nos grupos C_1 e C_2 era apenas mistura salina; nos grupos T_1 , T_2 , S_1 , S_2 era constituída por níveis menores de mistura salina e pelos minerais fornecidos pelos concentrados (Quadro I).

Comparando o crescimento dos animais e o aproveitamento do cálcio e fósforo entre os grupos C_1 e C_2 e os outros citados, podemos dizer que os concentrados são fontes aceitáveis para suplementação de dietas deficientes nesses elementos.

Esta possibilidade já foi verificada, no homem, por vários autores, como PRETORIUS & WEHMEYER (80), SHAPIRO & Col. (85), SHURPALEKAR e Col. (86) e SPENCER & Col. (91), - que estudaram, especificamente, concentrados de sardinha.

Os resultados obtidos para a retenção do cálcio e do fósforo nos grupos T₁ e T, S₁ e S, comparativamente, não parecem indicar que tais elementos sejam os responsáveis pela deficiência mineral observada, parecendo que o menor total fixado nos grupos T e S seja devido ao menor crescimento causado por alguma outra deficiência, ou ao menor peso inicial dos a nimais.

Esta constatação, bem como a observação de sinais de alopecia e o menor teor lipídico encontrado nesses grupos, levaram-nos a dosar o teor de potássio nos concentrados. Os resultados obtidos (vide tabela 2) mostram que, de fato, os teores de potássio se apresentaram baixos, parecendo indicar que - êsses produtos não são boa fonte dêste mineral.

Tal hipótese encontra apoio no trabalho - de DU BRUYN & DREHER (17), que observaram que a suplementação - com potássio acarreta desaparecimento das deficiências dos animais alimentados por concentrados da FIRI (rações contendo 4,4% de minerais).

Entre os minerais presentes nos concentrados de peixe, já salientamos a importância que tem o flúor como micronutriente ativo na prevenção da cárie dental. Assim, os concentrados passam a ser importantes como fonte natural do halogênio. Como foi discutido anteriormente, o teor de flúor, especialmente no concentrado de tilápia, é elevado, e os valores por nós obtidos são comparáveis aos apresentados por outros autores em concentrados de peixes integrais |CHAYET (7), DREOSTI (16), HADJIMARKOS (27), OLIVEIRA (73) e ZIPKIN & Col. (105)|.

A fixação nos ossos, do flúor contido nos concentrados, bem como a extensão dessa fixação é que vão dizer dos efeitos do halogênio sobre o organismo. Assim, procuramos - determinar êstes dois parâmetros: o resultado obtido revelou que o flúor dos concentrados se fixa no organismo, como é demonstrado pelo maior teor do halogênio nos animais que ingeriram concentrado, em relação, não só à quantidade de flúor que existia no começo da experiência, mas também em relação ao total fixado nos animais submetidos às rações-padrão.

Essa possibilidade de fixação permite explicar, pelo menos em parte, o efeito anticartogênico desses produtos, demonstrado por CHAYET (7), NIZEL & Col. (71), OPUZINSKA (74) e STEPHEN (92) (93).

O aproveitamento do flúor, entretanto, é pequeno, uma vez que apenas cerca de 20% do ingerido (a partir das dietas isomnerais) foi retido.

LEE e NILSON (44) obtiveram, para o aproveitamento biológico do flúor contido no salmão, os valores de 19,75 e 20,25%, e para o da cavala, 21,47 e 24,4%, em rações que continham, respectivamente, 5,8 e 19,3 ppm de flúor do primeiro peixe e 27,0 e 84,5 ppm do segundo. O aproveitamento do flúor de concentrados de Urophycis chuss, encontrado por ZIPKIN & Col. (105), foi de 24, 17 e 13% para rações contendo, respectivamente, 23, 50 e 80 ppm.

Os resultados por nós obtidos confirmam os desses autores, quando comparados nas mesmas concentrações de flúor na ração.

Pelos resultados de ZIPKIN & Col. (105), vemos ainda que, com o aumento do teor de flúor na ração, há uma diminuição do aproveitamento percentual. Já LEE & NILSON (44) - encontraram relação oposta. Os nossos resultados parecem concordar com os de ZIPKIN & Col., apesar de serem significativas apenas as diferenças entre os grupos T_2 e T_1 , e T_2 e S_1 .

Considerando que as dietas utilizadas por nós e pelos autores citados continham alto teor mineral, medimos o aproveitamento do flúor também nas rações T de S. Os resultados obtidos mostram que a utilização do halogênio é significativamente superior ($P < 0,01$) àquela obtida com as rações T_1 e S_1 ; observa-se que ao menor conteúdo mineral da ração corresponde um maior aproveitamento percentual. Naturalmente, nas rações T e S, comparadas com T_1 e S_1 , houve diminuição dos minerais totais e não apenas do cálcio; mas, tendo em vista principalmente os trabalhos de DONOVAN & MUHLER (14), LAWRENTZ & MITCHELL (41) (42), STOOKEY & Col. (95) (96) e WAGNER E MUHLER (100), parece lícito supor que esse efeito se deva, principalmente, ao menor teor daquele elemento.

A suposição acima levantada se fortalece pelas experiências de PETERS (75) e SPENCER (90): o primeiro encontrou baixa utilização do flúor do lambari (6%) em rações que

continham elevado teor de cálcio, enquanto que a alta fixação - (50%) encontrada pelo segundo, a partir do mesmo concentrado estudado por ZIPKIN & Col. (105), pode ser atribuída ao baixo teor mineral (de cálcio) da dieta.

Procurando, ainda que limitadamente, quantificar a fixação do halogênio, estabelecemos, a exemplo de POURCHET-CAMPOS (77), uma curva de regressão, relacionando o flúor na carcaça, com a sua concentração nas rações fornecidas aos animais.

Essa curva, com 99% de probabilidade, pode ser representada pela equação.

$$Y = 0.0672 X + 0.262 ,$$

onde X representa o teor de flúor na ração (ppm) e Y o flúor fixado em mg. Naturalmente, essa equação só é válida para os teores de minerais por nós utilizados (rações balanceadas T_1 , S_1 , T_2 e S_2).

Supondo-se um consumo diário de 20 g do concentrado, teríamos a ingestão de cerca de 4,6 mg de flúor a partir do concentrado de tilápia e de 1,6 mg a partir do de sardinha. Tendo em vista o aproveitamento obtido, o efeito biológico deve ser considerado cinco vezes inferior ao que seria proporcionado pela dose nominal (correspondente a 0,960 mg de flúor). Considerando como válido que o aproveitamento da fluorapatita é 50% menor que o equivalente de flúor como NaF [JACKSON & Col. (31), ARGENT & HEYROTH (39) e Mc CLURE & Col. (50)], podemos ainda admitir que a quantidade de flúor, nos concentrados, corresponde à metade dessa dose em NaF . No caso da tilápia, a contribuição do concentrado corresponderia, portanto, a 2,3 mg de flúor como NaF . Diante dos trabalhos de Mc CLURE & Col. (50), podemos dizer que essa dose não causaria o esmalte manchado, sendo maior a faixa de segurança para a sardinha.

Por outro lado, considerando-se a ingestão de dietas pobres em minerais, as doses acima seriam dobradas, parecendo apresentar riscos, apenas em regiões cuja água de abastecimento contenha altas concentrações de flúor e baixa dureza.

Pelo menos no caso das dietas normais, não nos parece haver necessidade da redução do teor de flúor nos concentrados para que possuam até 100 ppm, conforme exige o -

F.D.A., uma vez que isto acarretaria, de um lado, diminuição de nutrientes essenciais (cálcio, fósforo) e, por outro, diminuição também da eficiência anti cariogênica representada pelo halogênio, elemento que, por sua importância, foi recentemente considerado como micronutriente essencial (70).

Os concentrados protéicos, de alto teor - em aminoácidos essenciais, superiores à caseína, ricos em minerais, além do seu já analisado valor nutricional, apresentam-se com propriedades organolépticas bastantes favoráveis: sua cor é clara, são inodoros e insípidos. Em teste-piloto, foram preparados pães, cuja aceitação indicou a possibilidade do uso dêsses produtos como suplemento alimentar, o que os inclui entre as possíveis soluções, ou atenuantes, para o problema da fome e desnutrição.

9 - CONCLUSÕES

9.1 - O uso de isopropanol para a desidratação, desengorduramento e desodorização de Sardinella aurita e de Tilápia melanopleura permitiu a obtenção de concentrados protéicos com boas características organolépticas (inodoros e insípidos).

9.2 - O estudo bromatológico desses concentrados revelou:

I-Quanto à composição

1) São ricos em proteína (80%); sua fração protéica contém todos os aminoácidos essenciais, apresentando como fator limitante principal o baixo teor de sulfurados. O baixo teor de umidade e lípides fala em favor de sua boa conservação.

2) São ricos em minerais (10%), principalmente em cálcio, fósforo e flúor, devido à inclusão de ossos e esca-mas.

3) O concentrado de tilápia é rico em ferro, possuindo cerca de 50 mg por 100 g do produto.

4) Os teores de flúor são de 279 ppm no concentrado de tilápia e 82 ppm no de sardinha.

5) São pobres em sódio e potássio.

II-Quanto ao valor biológico

1)O cômputo protéico, calculado em relação à proteína do ovo, foi de 74 para o concentrado de tilápia e de 69 para o de sardinha, mostrando correlação com o aproveitamento percentual do nitrogênio.

2)A proteína dos concentrados é superior à caseína.

3)Considerando os concentrados de tilápia e de sardinha do ponto de vista protéico, aquele tem superioridade sobre este.

4)Não são fontes completas de minerais, capazes de suportar o crescimento de animais jovens, exigindo suplementação com misturas salinas.

5)A suplementação dos minerais dos concentrados, com mistura salina em dois níveis, mostra ser satisfatória na manutenção do crescimento.

6)Oferecem bom aproveitamento de cálcio e fósforo.

7)O aproveitamento do flúor, a partir de rações normais, foi de cerca de 20%, manifestando tendência a diminuir com aumento do teor do halogênio na ração.

8)Não parece haver necessidade de redução do teor de flúor dos concentrados, já que seus efeitos biológicos correspondem a 1/5 dos da dose nominal, sendo o aproveitamento função do teor de minerais na dieta.

9)O flúor fixado na carcaça em mg (Y) pode ser expresso em função da sua concentração na ração, em ppm (X), pela equação $Y = 0,0672 + 0,262X$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ALCAREZ-BAYAN, A.- Composition and biological quality of dill's fish flour. Philippine. Educ. Forum 10(2): 32, 1960. Apud. Chem. Abstr., Columbus, Ohio, 57: 14, 248c, 1962.
- 2- ASSOCIATION OF OFFICIAL AND AGRICULTURAL CHEMISTS.- Official Methods of Analysis, 10th ed., Washington, D.C., 1965, p. 7 5-786.
- 3- BASU, K.P. et alii - Studies in human nutrition. V. The bones of small fish as a source of nutritionally available calcium and phosphorus. Indian J. med. Res., Calcutá, 30(3): 417-422, 1942.
- 4- BENDER, A.E. & HAIZELDEN, S.- Biological value of the proteins of a variety of fish meals. Br. J. Nutr., Cambridge, 11(1): 42-43, 1957.
- 5- BROWN, N. et alii - Studies on the fluoride partition in fish
|comunicação pessoal|
- 6- BUTTNER, W. & MUHLER, J.C.- The effect of a diet composed of barley and fish meal on dental caries in rats. J. dent. Res., Baltimore, 37(3): 419-421, 1958.
- 7- CHAYET, C. et alii - Efecto de la harina de pescado de consumo humano. (Unicef-Chile-Quintero) sobre la caries experimental en la rata blanca. Nutrición Bromatol. Toxicol. - Santiago de Chile, 5(1): 20-24, 1966.
- 8- DE, H.N.- A note on the relative nutritive value and the total and "available" methionine, Tryptophane and histidine in some fish flours. Pakistan J. Sci. ind. Res., Karachi, 6: 299-301, 1963.

- 9- DE, H.N. & HANNAN, A.- Fish flour its biochemical and nutritional studies. I. Yield and chemical composition of fish protein concentrate (FPC) and fish meal (FM) prepared from various freshwater fish of East Pakistan by application of improved techniques-Sci. Res., (Dacca, Pakistan) 2(3): 85-94, 1965.
- 10-DE, H.N. et alii - Fish Flour. Biochemical and nutritional studies. II. Utilization of protein of fish flour or fish protein concentrate (FPC) under different dietary level in body protein synthesis and fat deposition in relation to growth of immature and adult rats, Sci. Res., Dacca, Pakistan, 2(3): 118-126, 1965. Apud: Chem. Abstr., Columbus, Ohio, 65: 20582 fg, 1966.
- 11-DE, H.N. et alii - Fish flour. Biochemical and nutritional studies. III.- Protein efficient ratio value of some fish protein concentrate (FPC) or fish flour and fish vermicelli, and influence of decomposition of fish on the above values-Sci. Res. (Dacca, Pakistan) 2(3): 127-134, 1965. Apud: Chem. Abstr., Columbus, Ohio, 65: 20583b, 1966.
- 12-DONOSO, G. & YÁÑEZ, E.- La utilización proteica neta de harinas de pescado de consumo humano y animal fabricados en Chile. Nutrición. Bromatol. Toxicol., Santiago de Chile, 1(2): 97-105, 1962.
- 13-DONOSO, G. et alii - Effect of heat treatment on the nutritive value of proteins: chemical and balance studies-J. Sci. Fd. Agric., London, 13(): 192-196, 1962.
- 14-DONOVAN, A.W. & MÜHLER, J.C.- The effect of inorganic salts on fluorine storage in the rat. J. Nutr., Baltimore, 54(3): 437-444, 1954.
- 15-DREOSTI, G.M.- Fish flour. Technological developments in South Africa. In: HEEN, E. & KREUZER, R. (ed.)-Fish in Nutrition, London, Fishing News (Books) Ltd., 1962, p. 425-431.

- 16-DREOSTI, G.M.- The role of South African fishing industry in feeding the nation. S.Afr.med.J., Cape Town, 38:631-640, 1964.
- 17-DUBRUYN, D.B. & DREYER, J.J.- Studies on the nutritive value of the mineral components of a South African fish flour, with special reference to the effect of supplementation with potassium. Proc.Nutr.Soc.S.Afr., Pretoria, 2:59-68, 1961.
- 18-F.A.O. NUTRITION DIVISION - The use of fish flour as human food - Proc.Nutr.Soc., Cambridge, 17(2):153-160, 1958.
- 19-F.A.O.-NUTRITION DIVISION-FOOD CONSUMPTION AND PLANNING BRANCH-Amino acids contents of foods and biological data on proteins, Rome, 1968, 280p.
- 20-F.A.O./W.H.O.- Protein Requirement-Report of a joint FAO/WHO Expert Group, Rome, 1965 |FAO Nutrition Meeting Report Series, nº 37; WHO Technical Report Series, nº 301. |
- 21-FERREIRA, F.A.G. & GRAÇA, M.E.DA SILVA - Tabela da composição de alimentos portugueses. Lisboa, Ministério da Saúde e Assistência, 1963, 186 p.
- 22-FERRO, P.V.A.S. & HAM, A.N.- Colorimetric determination of calcium by chloranilic acid.II.A semimicro method with reduced precipitation time.Am.J.clin.Path., Baltimore, 28(6): 689-692, 1957.
- 23-FISKE, C.H. & SUBAROW, U.- The colorimetric determination of phosphorus. J.Biol.Chem., Baltimore, 66(2):375-400, 1925
- 24-GOYCO, J.A. & ASENJO, C.F.- La suplementación de la ración rural puertorriqueña con proteína de pescado. Archos Lat.-Amer.Nutr., 17(3):241-251, 1967.

- 25- GUTTMANN, A. & VANDENHEUVEL, F. A. - The production of edible - fish protein ("Fish flour") from cod and haddock - Fish, Res. Bd. Canada Prog. Rep. Atlant. Coast St. N^o 67:29-31, 1957.
- 26- HADJIMARKOS, D. M. - Fish flour and fluoride - Science, New York, 152(3729): 1507, 1966.
- 27- HADJIMARKOS, D. M. - Fluoride in fish flour - effect on teeth. J. Pediat. St. Louis, Mo, 65(5):782-784, 1964.
- 28- HARVEY, W. - Fluorine in fish pastes - Nature, London, 155(3928): 175, 1945.
- 29- HOWE, E. E. et alii - Amino acid supplementation of protein - concentrates as related to the world protein supply. J. clin. Nutr., Allentown, 16(3): 321-326, 1965.
- 30- JACKSON, D. & WEIDMANN, S. M. - The relationship between age - and the fluorine content of human dentin and enamel. A regional survey. Br. dent. J., London, 107(10): 303-306, 1959.
- 31- JACKSON, S. H. et alii - The retention of fluoride when fed as bone and as sodium fluoride. J. Nutr., Baltimore, 40(4): 515-535, 1950.
- 32- JAFFE, W. G. - Nuevas observaciones sobre el valor nutritivo de la harina de pescado y su efecto suplementario sobre harina de trigo y pan - Archivos Venez. Nutr., Caracas, 11(2):191-204, 1961.
- 33- KADKOL, S. B. & LAHIRI, N. L. - Amino acid composition of defatted fish flour from oil sardine (Clupea longiceps). J. scient. ind. Res., New Delhi, 21 D (10): 387-388, 1962.
- 34- KNOBL Jr., G. M. - The fish protein concentrate story - 4. World efforts toward FPC - Fd. Technol., Champaign, 21 (8):1108-1110, 1967.

- 35- KONING, A.J. & Mc MULLAN, K.B. - Phospholipids of marine origin. III- The pilchard (*S. ocellata*) with particular references to oxidation in pilchard meal manufacture. *J. Sci. Fd. Agric.*, London, 17(8): 385-388, 1966.
- 36- KURTZMAN, C.H. et alii -Effect of several processing variables on the protein content and quality of fish flour. In HEEN, E. & KREUSER, R. (ed) -*Fish in nutrition*, London, Fishing News (Books) Ltd., 1962, p.228.
- 37- LAHIRY, N.L. et alii -Preparation of edible fish flour from oil sardine (*Clupea longiceps*), *Fd. Sci., Mysore*, 11(2): 37-39, 1962. Apud *Nutr. Abst. Rev.*, Aberdeen, 33(1): 91, 1963.
- 38- LAJOLO, F.M. et alii -Influência da côr no consumo de rações por ratos. *Rev. Fac. Farm. Bioquim. S. Paulo*, 7(1), 1969. No prelo
- 39- LARGENT, E.J. & HEYROTH, F.F. -The absorption and excretion of fluorides III. Further observations on metabolism of fluorides at high levels of intake. *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, New York, 31 (3): 134-188, 1949.
- 40- LARSEN, B.A. & HAWKINS, W.W. -The quality of fish flour, liver meal and visceral meal as source of dietary protein. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, Ottawa, 18 (1): 85-91, 1961.
- 41- LAWRENCE, M. & MITCHELL, H.H. -The effect of dietary calcium and phosphorus on the assimilation of dietary fluorine. *J. Nutr.*, Baltimore, 22(1): 91-101, 1941
- 42- LAWRENZ, M. & MITCHELL, H.H. -The relative assimilation of fluorine from fluorine-bearing minerals and food (tea) and from water and food. *J. Nutr.*, Baltimore, 22(6): 621-631, 1941.
- 43- LEA, C.H. et alii -Chemical and nutritional changes in stored herring meal. 2. *Br. J. Nutr.*, Cambridge, 14(1): 91-113, 1960

- 44- LEE, C.F. & NILSON, H.W.- Study of the metabolism of naturally occurring fluorine in canned salmon and mackerel. Washington, D.C., U.S. Department of Commerce. Bureau of Fisheries, 1939, 15 p. |Investigational Report n^o 44|
- 45- LEVERTON, R.M. & PAYAWAL, S.M.- The physiological availability of calcium, phosphorus and nitrogen from the bones and flesh of dilis, a small fish used in Filipino diet. Philippine J. Sc., Manila, 80: 23-32, 1951. Apud: Nutr. Abstr. Rev., Aberdeen, 22(1): 175, Abstr. 892, 1952.
- 46- LEVIN, E. - Fish flour and fish meal by azeotropic solvent processing. Fd. Technol., Champaign, 13(2), 132- 1959.
- 47- LOVERN, L.A.- General outlook for edible fish protein concentrates. In ALTSCHUL, A.M.- World protein resources. Washington D.C., American Chemical Society, 1966, p. 37-51. |Advances in chemistry series, 57.|
- 48- Mc LURE, F.J.- Fluorine in foods-Survey of recent data-Publ. Hlth. Rep., Washington, 64(34): 1061-1074, 1949.
- 49- Mc LURE, F.J.- Fluorine in food and drinking water-Dental health benefits and physiologic effects. J. Am. diet. Ass., Baltimore, 29(6): 560-564, 1953.
- 50- Mc LURE, F.J. et alii - Balances of fluorine ingested from various sources in food and water by five young men. Excretion of fluorine through the skin. J. ind. Hyg. Toxicol., New York, 27(6): 159-170, 1945.
- 51- MANTEL, N.- Rapid estimation of standard error of means for small samples. Am. Statistn., 5: 26-27, 1951.
- 52- MARCH, B.E. et alii - Composition and nutritive value of meals from alewife, sheepshead, maria and tullibee-J. Fish. Res. Bd. Can., Ottawa, 24(6): 1291-1298; 1967.
- 53- MARIER, J.R.- Fluoride research (meeting). Science, New York, 159(3822): 1494-1495, 1968.

- 54- MASSLER, M. & SCHOUR, I.- Relation to endemic dental fluorosis to malnutrition. J. Am. dent. Ass., Chicago, 44(2):156-165, 1952.
- 55- MEGREGIAN, S.- Rapid spectrophotometric determination of fluoride with zirconium-eriochrome-cyanine R lake. Analyt. Chem., Easton, 26(7): 1161-1166, 1964.
- 56- METTA, V.C.- A study in improving East Indian diets. Nutritional value of fish flour supplements. J. Am. Diet. Assoc., Baltimore, 37(3): 234-240, 1960.
- 57- MILLER, E.L.- Determination of the tryptophan content of feedingstuff with particular reference to cereals. J. Sci. Fd. Agric., London, 18(9):381-386, 1967.
- 58- MILLER, D.S. & BENDER, A.D.- The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. Br. J. Nutr., London, 9(4): 382-388, 1955.
- 59- MORRISON, A.B.- Factors influencing the nutritional value of fish flour. III. Further studies on availability of amino acids. Can. J. Biochem. Physiol., Ottawa, 41(7): 1589-1594, 1963.
- 60- MORRISON, A.B.- The influence of solvent extraction on the nutritive value of fish proteins. In: HEN, E. & KREUZER, R. (ed.) Fish in nutrition, London, Fishing News (Books) Ltd., 1962. p.201-206.
- 61- MORRISON, A.B. & CAMPBELL, J.A.- Studies on the nutritional value of defatted fish flour. Can. J. Biochem. Physiol., Ottawa, 38(5): 467-473, 1960.
- 62- MORRISON, A.B. & McLAUGHLAN, J.M.- Variability in nutritional value of fish flour. Can. J. Biochem. Physiol., Ottawa, 39(3): 511-517, 1961.

- 63- MORRISON, A.B. & MURNO, I.C.- Factors influencing the nutritional value of fish flour. IV. Reaction between 1,2-dichloroethane and protein. Can. J. Biochem., Ottawa, 43(1):33-40, 1965.
- 64- MORRISON, A.B. & SABRY, Z.I.- Factors influencing the nutritional value of fish flour. II. Availability of lysine and -sulfur amino acids. Can. J. Biochem. Physiol., Ottawa, 41(3): 649-655, 1963.
- 65- MORRISON, A.B. et alii - Factors influencing the nutritional value of fish flour. I. Effects of extraction with chloroform or ethylen dichloride. J. Nutr., Baltimore, 77(1):97 - 104, 1962.
- 66- MUHLER, J.C. & STOOKEY, G.K.- Metabolic availability of fluoride from oyster shells. J. dent. Res., Baltimore, 39(4):858, 1960.
- 67- MURNO, I.C. & MORRISON, A.B.- Factors influencing the nutritional value of fish flour: V-chlorocholine chloride, a toxic material in samples extracted with 1,2-dichloroethane, - Can. J. Biochem., Ottawa, 45(7): 1049-1053, 1967.
- 68- MURNO, I.C. & MORRISON, A.B.- Toxicity of 1,2-dichloroethane extracted fish protein concentrate. Can. J. Biochem., Ottawa, 45(11): 1779-1781, 1967.
- 69- MURRAY, M.M. & WILSON, D.C.- Fluorine and nutrition in Morocco. Dental studies in relation to environment. Br. dent. J., London, 84(5): 97-100, 1948.
- 70- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE-NATIONAL RESEARCH COUNCIL, FOOD AND NUTRITION BOARD-Reccomended dietary allowance. 7 th. Rev. Ed. Publication, 1964, Washington D.C., 1968, 101p. Apud Fluoride Abstract 1966/68, Sect. 4, Abst. 160.
- 71- NIZEL, A.E. et alii - The effect of feeding fish protein conocentrate (FPC) in different amounts on caries developement in rats. INTERNATIONAL ASSOCIATION DENTAL RESEARCH. 47 th.

General Meeting, Houston, march, 1969-Program and abstracts of papers. Chicago, 1969, p.65, abstr.97.

- 72- OLCOTT, H.S.- Oxidation of fish lipids. In: HEEN, E. & KREUZER, R. (ed.) Fish in nutrition. London, Fishing News (Books) Ltd. 1962, p.112-116.
- 73- OLIVEIRA, J.N.- Oligoelementos em farinhas de milho e de peixe. An. Fac. Farm. do Pôrto, 15:5-31, 1955.
- 74- OPUSZINSKA, T.- Badania nad Rola maozkirycznej w profilaktyce prochnicy Zebow u Bialych Szczurow. Roczniki Panstwowego Zakladu Hig., Warszawa, 17(3): 289-295, 1966.
- 75- PETERS, C.F.- A fixação de flúor de lambarís (Astyanax-imaculatus e fascinateus). Seu efeito sôbre a solubilidade, em ácido do esmalte dental de ratos brancos. (Rattus norvegicus, var. albinus, Rodentia, Mammalia) Piracicaba, 1969, 60p. |Tese|
- 76- POURCHET-CAMPOS, M.A.- Atuais conhecimentos sôbre o metabolismo do flúor. An. Farm. Quim. S. Paulo, 6(3): 18-25, 1953.
- 77- POURCHET-CAMPOS, M.A.- Contribuição para o estudo da fixação do flúor alimentar. An. Fac. Farm. Odont. Univ. S. Paulo, 11: 93-148, 1953.
- 78- POWER, H.E.- Characteristics and nutritional value of various fish protein concentrates. J. Fish. Res. Bd. Can., Ottawa, 21(6):1489-1504, 1964.
- 79- POWER, H.E.- An improved method for the preparation of fish - protein concentrate from cod. J. Fish. Res. Bd. Can., Ottawa, 19(6):1039-1045, 1962.
- 80- PRETORIUS, P.J. & WEHMEYER, A.S.- An assessment of nutritive value of fish flour in the treatment of convalescent kwashiorkor patients. Am. J. clin. Nutr., New York, 14(3) 147 - 156, 1964.

- 81- SAMBUCETTI, E. & SANAHUJA, J.C. - Estudio del valor nutritivo de los concentrados proteicos de origen animal (harina - de pescado) In: Congresso Panamericano de Farmácia e Bioquímica, Buenos Aires, 1966 [Abstract]
- 82- SÃO PAULO-INSTITUTO ADOLFO LUTZ-Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz-V.1 - Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, São Paulo, p.28.
- 83- SCHEDEL, H.E. & JOHSON, C.B.- Performance of rats fed fish - flour or casein as the sole source of dietary protein - through four generations. J. Nutr., Baltimore, 78(4):457-460, 1962.
- 84- SCHMITZ, C.M. & DA SILVA, C.M. - Moluscos comestíveis do Brasil Teor de flúor em mexilhões, berbigões e sururu. An. Farm. Quim. S. Paulo, 11(11/12): 163-166, 1960.
- 85- SHAPIRO, M. et alii - Beneficial effects of fish protein concentrate on the bones and teeth of rats fed a rachitogenic diet. INTERNATIONAL ASSOCIATION DENTAL RESEARCH, 47th. General Meeting, Houston, march, 1969 -Program and abstracts of papers. Chicago, 1969, p.65, abstr. 98.
- 86- SHURPALEKAR, S.R. et alii - The effect of a supplementary protein food containing fish flour (from oil ardine) on the metabolism of nitrogen, calcium and phosphorus in children. Indian J. Pediat., Mysore, 30(187): 272-275, 1963.
- 87- SHURPALEKAR, S.R. et alii - Supplementary value of proteins of fish flour to those of groundnut flour and protein efficient ratio of a protein food containing groundnut, bengalgram and fish flours. Fd. Sci., Mysore, 11(2): 42-44, 1962. Apud: Nutr. Abstr. Rev., Aberdeen, 33(1): 91- Abs. 515, 1963.
- 88- SOGNAES, R.F.- A condition suggestive of threshold dental fluorosis observed in Tristan da Cunha. I. Clinical condition of the teeth. J. dent. Res., Baltimore, 20(4):303-313, 1941.

- 89- SOGNAES, R.F. & ARMSTRONG, W.D.- A condition suggestive of threshold dental fluorosis observed in Tristan da Cunha II. Fluorine content of the teeth. J.dent.Res., Baltimore, 20(4) : 315-322, 1941.
- 90- SPENCER, H. et alii - Fluoride balance in man. INTERNATIONAL ASSOCIATION DENTAL RESEARCH, 46 th. General Meeting, Houston, march, 1968- Program and abstracts of papers, Chicago, 1968, p.65, abstr. 279.
- 91- SPENCER, H. & col.- Utilization of fish protein concentrate in man. Fed.Proc. 27(2): Abstr. 1169, 1968.
- 92- STEPHAN, R.M.- Anticariogenic effect of fish powder supplements in experimental diets fed to rats. INTERNATIONAL ASSOCIATION DENTAL RESEARCH. 47 th. General Meeting, Houston, - march, 1969- Program and abstracts of papers. Chicago, 1969, p.65, abstr. 100.
- 93- STEPHAN, R.M.- Effect of fish and milk powders versus sugars on caries in rats. INTERNATIONAL ASSOCIATION DENTAL RESEARCH. 46 th. General Meeting, Houston, 1968- Program and abstracts of papers. Chicago, 1968, p.65, abstr. 365.
- 94- STILLINGS, B.R. et alii - Sequence of limiting amino acids in fish protein concentrate produced by isopropyl alcohol extraction of red hake (Urophycis chuss). J.Nutr., Baltimore, 97(1): 70-78, 1969.
- 95- STOOKEY, G.K. et alii - Further studies on fluoride absorption- Proc.Soc.Exp.Biol.Med., N.York, 115: 295-298, 1964.
- 96- STOOKEY, G.K. et alii - In vitro studies concerning fluoride absorption. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., New York, 115: 278-301, 1964.
- 97- SURE, B.- The addition of small amounts of defatted fish flour to whole yellow corn, whole wheat, whole and milled rye - grain sorghum and millet. I. Influence on growth and protein efficiency. II. Nutritive value of mineral in fish flour. J.Nutr., Baltimore, 63 (4): 409-416, 1957.

- 98- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH EDUCATION AND WELFARE, Food and Drug Administration. Rules and regulations, §121.1202: whole - fish protein concentrate. Fed. Reg., Washington, D.C. 32(22): 1174, 1967.
- 99- U.S. DEPT OF THE INTERIOR FISH AND WILDLIFE SERVICE, Bureau of Commercial Fisheries-Marine protein concentrate. Washington, 1966, 26 p. |Fishery Leaflet, 584|
- 100-WAGNER, M.J. & MUHLER, J.C.- The effect of calcium and phosphorus on fluoride absorption. J. dent. Res., Baltimore, 39 (1): 49-52, 1960.
- 101-WALDBOTT, G.L.- Perspectives in nutrition. Fluoride in food. Am. J. clin. Nutr., New York, 12(6): 455-462, 1963.
- 102-YÁÑEZ, E. & DONOSO, G.- Harina de pescado, aspectos biológicos tecnológicos y económicos. Nutrición Bromatol. Toxicol., Santiago de Chile, 3(2): 43-62, 1964.
- 103-YÁÑEZ, E. et alii - The fish protein concentrate story. 6. Quinto fish protein concentrate: protein quality and use in foods. Fd. Technol., Champaign, 21(12): 1604-1610, 1967.
- 104-ZIPKIN, I. & McLURE, F.J. = Deposition of fluorine in the bones and teeth of the growing rat. J. Nutr., Baltimore, 47(4): 611-620, 1952.
- 105-ZIPKIN, I. et alii - The biological availability of the fluoride of fish protein concentrate (F.P.C.) in the rat. - No prelo |comunicação pessoal|
- 106-ZIPKIN, I. et alii - Deposition of fluoride, calcium and phosphorus in experimental-low phosphorus rickets. J. Nutr., Baltimore, 67(1): 59-67, 1959.
- 107-ZUCAS, S.M. & LAJOLO, F.M.- Frasco de difusão para o isolamento de pequenas quantidades de flúor-Rev. Fac. Farm. Bioquim.

S. Paulo, 6(1): 33-34, 1968.

108-ZUCAS, S.M. et alii - *Gaiola metabólica para ratos ensaiada com ^{65}Zn |enviado para publicação|*
