

**ESTUDO BROMATOLOGICO DE CONCENTRADOS PROTEICOS
OBTIDOS A PARTIR DA SARDINELLA AURITA
E DA TILAPIA MELANOPLURA**

II.—ENSAIO DOS MINERAIS

*Franco Maria Lajolo, Sérgio Miguel Zucas,
João Baptista Domingues*

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da USP.
Brasil.

RESUMO

Os autores estudaram a utilização biológica dos minerais totais, do cálcio, do fósforo e do flúor, em concentrados proteicos de Sardinha e de Tilápia, obtidos dos peixes integrais.

O cálcio e o fósforo são bem aproveitados mas a fração mineral total mostrou-se insuficiente na manutenção do crescimento normal de animais jovens.

Tanto a absorção como a utilização biológica do fluor foram baixas, sendo que o total fixado pelos animais depende da concentração do mesmo na ração, segundo a equação:

$$Y = 0,0672X + 0,202$$

onde,

Y = mg de flúor fixado na carcaça

X = ppm do halogênio na ração.

Devido a essa baixa utilização, não parece haver necessidade de reduzir os teores do halogênio nos concentrados de peixes.

Recibido: 8-10-75

Em casos de deficiência mineral na dieta, a utilização do flúor aumenta proporcionalmente à deficiência, sendo que os teores de cálcio na ração parecem regular a sua absorção.

A eliminação urinária do flúor parece ser menos importante do que a absorção intestinal na regulação do total utilizado.

INTRODUÇÃO

Os concentrados proteicos de pescados (CPP), quando preparados a partir dos peixes inteiros, apresentam, além da riqueza em proteínas, elevado teor em minerais, originados da inclusão de resíduos de ossos e escamas; —poucos estudos porém, têm sido feitos sobre a sua utilização biológica.

SURE⁽¹⁾ mostrou que os minerais de concentrados de peixes eram tão eficazes, na promoção do crescimento de ratos, quando uma mistura salina de boa qualidade. Parece, também, que o cálcio de pequenos peixes encontra-se numa forma bem aproveitável pelo organismo^{(2) (3)}, o que foi demonstrado inclusive em convalentes de Kwashiorkor^{(4) (5)}.

Segundo vários autores^{(6) (7) (8) (9)}, os minerais de CPP parecem ter influência na prevenção da cárie dental, mesmo quando incluídos na dieta em pequena percentagem, embora outros pesquisadores^{(10) (11)} tenham obtidos bons resultados apenas com ou uso de grandes quantidades.

Nos Estados Unidos, o FDA⁽¹²⁾ limitou em 100 ppm o conteúdo máximo permissível de flúor em CPP, em virtude de possível efeito tóxico (esmalte manchado), que poderia advir do consumo prolongado dessas fontes proteicas. Mais recentemente essa limitação foi estabelecida em relação ao produto que contém o CCP que não deve ter mais de 8 ppm em relação ao peso seco — não do concentrado em si⁽¹³⁾.

Com relação porém à utilização do halogênio de CPP há divergências; ZIPKIN e col.⁽¹⁴⁾, obtiveram apenas uma baixa fixação em ratos; já SPENCER e col.⁽¹⁵⁾, verificaram o oposto.

Os primeiros forneceram a ratos dietas com elevados teores de cálcio e de flúor: 20, 50 ou 80 ppm, originados, respectivamente, dos concentrados de peixe ou de NaF adicionado às rações

controle contendo caseína; trabalhando com fêmeas jovens, viram que o aproveitamento biológico, medido pela fixação do halogênio em vários ossos, era de apenas 20-50% daqueles obtidos para teores semelhante de NaF.

Já, SPENCER e col.⁽¹⁵⁾, trabalharam com teores menores de flúor, originados de CPP ou então de NaF, adicionados a dietas de humanos e verificaram que a utilização do flúor original do CPP era da ordem de 88% e aquela do NaF da ordem de 94%, portanto semelhante e elevados.

Em trabalho anterior⁽¹⁶⁾, apresentamos resultados referentes ao estudo das proteínas dos concentrados de sardinha e de tilápia; no presente trabalho apresentamos os resultados referentes à utilização de alguns dos seus minerais.

MATERIAL E METODOS

Os concentrados proteicos, os animais (ratos jovens, machos recém desmamados) e as rações, foram os mesmos utilizados no trabalho anterior, referente ao ensaio das proteínas⁽¹⁶⁾.

Os grupos experimentais foram designados por C₁ e C₂ (caseína); T, T₁ e T₂ (contendo concentrados de Tilápia) e S, S₁ e S₂ (contendo concentrados de Sardinha). Os índices 1 e 2 referem-se aos níveis de proteína, respectivamente de 10 e 20%, sendo que nessas rações houve suplementação com misturas salina até o nível de 4%. Já nos grupos T e S, o nível de proteína foi de 10% mas não houve qualquer suplementação mineral. A mistura salina utilizada na suplementação possuía todos os minerais necessários e foi descrita anteriormente.⁽¹⁶⁾

Os teores dos vários minerais nos concentrados, encontra-se na Tabela 1, e os das rações utilizadas, na Tabela 2.

A digestibilidade e o aproveitamento biológico dos minerais foram avaliados, respectivamente, como a percentagem do ingerido que foi eliminado pelas fezes ou fixado na carcaça dos animais. A quantidade fixada de cada mineral, foi obtida por diferença entre o total do mineral nas carcaças no fim da experiência e o inicial, obtido a partir de um grupo sacrificado no tempo "zero" e extrapolado segundo o peso inicial dos animais em cada caso. O total inicial foi da ordem de 25 mcg de flúor, 230 mg de

TABLA 1

TEORES DE ALGUNS MINERAIS NOS CONCENTRADOS
PROTEICOS (mg/100 g)

Minerais	CONCENTRADO	
	Tilápia	Sardinha
TOTAIS	12,10 *	10,19 *
CALCIO	3.154,0	2.866,0
FOSFORO	2.412,0	1.918,0
FERRO	50,7	9,1
SODIO	274,7	226,8
POTASSIO	649,8	612,5
FLUOR (ppm)	229	82

* Expressos em g %

TABLA 2

TEORES PERCENTUAIS DE MINERAIS
NAS RACOES EXPERIMENTAIS

Ração	Minerais Totais	Cálcio	Fósforo	Flúor (ppm)
C ₁	3.45	1.011	0.627	2.72
C ₂	3.58	1.009	0.711	2.41
S	1.41	0.373	0.268	11.10
S ₁	3.56	0.995	0.634	10.71
S ₂	4.04	1.112	0.845	21.55
T	1.66	0.447	0.297	26.16
T ₁	3.70	1.046	0.601	27.73
T ₂	3.94	1.053	0.684	53.14

fósforo, 310 mg de cálcio. A duração da experiência foi de 28 dias. No Balanço do flúor a urina e as fezes eram coletadas diariamente fazendo-se um "pool" semanal de material eliminado para cada rato; Tendo em vista porém que a concentração do halogênio não mostrou grandes variações nas 4 semanas da experiência, foi feito um "pool" total da urina eliminada nos 28 dias.

Os vários minerais foram determinados nas cinzas obtidas das carcaças secas e desengorduradas, sendo que o cálcio foi determinado pelo método de FERRO e HAM⁽¹⁷⁾, o fósforo segundo FISKE e SUBARON⁽¹⁸⁾, o flúor pela técnica de ZUCAS E LA-JOLO⁽¹⁹⁾ e o sódio e potássio em espectrofotometro de chama, na determinação de flúor na urina, a adição de AgNO_3 aos frascos de difusão permitiu eliminar a interferencia dos cloretos.

RESULTADOS E DISCUSSAO

As análises efectuadas (Tabela 1) nos concentrados obtidos evidenciaram a riqueza em cálcio, fósforo e flúor e a boa relação Ca/P, próxima da considerada ideal. Os elevados teores de flúor não são de estranhar, devido à inclusão dos ossos e escamas dos peixes; análises realizadas em nosso laboratório acusaram concentrações de 2.300 ppm de flúor nos ossos e de 1.320 ppm nas ossos e escamas de Tilápias, e de 426 e 76 ppm, respectivamente, nos ossos e escamas de Sardinhas. Verificou-se ainda que esses teores parecem aumentar com a idade e com as fases de ossificação dos peixes.

Comparando as rações $S \times S_1$ e $T \times T_1$ verifica-se (Tabela 3) que a falta de suplementação mineral causou menor aproveitamento proteico e menor crescimento ($P < 0,01$), indicando alguma deficiência mineral quali e/ou quantitativa. Por exemplo, o crescimento do grupo T_1 foi de 126,2 g contra apenas 71,8 do grupo T, isoproteico mas sem suplementação mineral; da mesma forma o aumento de peso do grupo S_1 foi de 131,2 g contra apenas 76,10 g para o grupo S.

Essa deficiência observada não parece ser causada pela falta de cálcio ou de fósforo, pois esses minerais existem nas rações em quantidades suficientes (Tabela 2) e o seu aproveitamento bioló-

TABLA 3
BALANCO DO CALCIO E DO FOSFORO

Grupo	Ca (mg)			p (mg)			Aumento de Peso
	Ingerido	Fecal	Carcaça	Ingerido	Fecal	Carcaça	
C ₁	3,157	1,798	0,766	1,958	1,117	0,563	90,8
	± 0,090	± 0,475	± 0,024	± 0,056	± 0,040	± 0,021	± 3,8
C ₂	3,331	2,181	1,062	2,347	1,118	0,827	148,6
	± 0,029	± 0,060	± 0,024	± 0,021	± 0,054	± 0,014	± 4,8
T	1,122	0,310	0,574	0,766	0,213	0,482	71,8
	± 0,024	± 0,013	± 0,017	± 0,016	± 0,007	± 0,017	± 2,3
T ₁	3,669	1,927	0,874	2,113	1,212	0,722	126,2
	± 0,095	± 0,076	± 0,030	± 0,054	± 0,066	± 0,019	± 6,0
T ₂	3,909	2,217	1,030	2,539	1,290	0,898	155,0
	± 0,116	± 0,110	± 0,035	± 0,075	± 0,521	± 0,038	± 6,0
S	0,924	0,915	0,581	0,666	0,119	0,491	76,10
	± 0,023	± 0,149	± 0,013	± 0,015	± 0,013	± 0,009	± 3,33
S ₁	3,641	2,191	0,931	2,320	1,276	0,752	131,2
	± 0,098	± 0,102	± 0,028	± 0,063	± 0,057	± 0,019	± 5,4
S ₂	3,972	2,227	1,115	3,018	1,386	0,920	148,4
	± 0,044	± 0,042	± 0,044	± 0,035	± 0,058	± 0,027	± 4,3

TABLA 4

BALANCO DO FLUOR

Grupo	Ingerido	Fecal	Carcaça		
			F. Total	ppm	Urina (mg)
C ₁	0,851	---	0,181	7,15	---
	+ 0,024	---	+ 0,013	+ 0,54	---
C ₂	0,797	---	0,118	3,34	---
	+ 0,007	---	+ 0,130	+ 0,32	---
T	6,568	+ 2,893	2,968	121,27	623
	+ 0,137	+ 0,094	+ 0,084	+ 2,88	+ 30,0
T ₁	9,726	+ 6,568	1,978	54,66	454
	+ 0,252	+ 0,366	+ 0,096	+ 2,44	+ 23,1
T ₂	19,560	+ 12,092	3,714	81,48	1130
	+ 0,584	+ 0,758	+ 0,098	+ 2,19	+ 62,5
S	2,752	+ 0,634	1,455	57,23	530
	+ 0,070	+ 0,035	+ 0,044	+ 1,81	+ 37,1
S ₁	3,918	+ 2,685	0,868	23,67	180
	+ 0,106	+ 0,094	+ 0,037	+ 0,96	+ 14,2
S ₂	7,697	+ 4,606	1,572	36,41	601
	+ 0,090	+ 0,141	+ 0,031	+ 0,58	+ 51,3

TABLA 5

ELIMINACAO FECAL E APROVEITAMENTO COMO PERCENTAGEM DO INGERIDO

Grupo	Cálcio		Fósforo		Flúor	
	Fecal	Carcaça	Fecal	Carcaça	Fecal	Carcaça
C ₁	57,10	24,35	57,11	28,80	---	21,23
	1,96	0,93	1,32	1,35	---	1,35
C ₂	65,50	31,89	47,61	35,24	---	14,76
	1,42	0,66	2,20	0,55	---	1,61
T	27,73	63,05	28,70	73,86	44,04	45,3
	1,88	2,39	1,12	1,23	1,20	1,04
T ₁	52,50	25,58	57,23	32,42	67,32	20,38
	1,49	0,20	2,12	0,57	2,18	1,14
T ₂	56,54	28,06	50,76	30,36	61,65	18,99
	1,18	1,34	0,60	1,09	2,40	0,36
S	21,14	51,15	17,83	64,70	23,03	52,92
	1,51	0,78	1,85	1,98	1,16	1,84
S ₁	60,04	23,83	54,98	34,19	68,45	22,17
	1,36	0,44	1,09	0,58	0,98	0,080
S ₂	56,06	26,34	45,86	35,32	59,80	20,44
	0,70	0,40	1,94	0,50	1,32	0,58

gico parece ser bom. De fato, como se vê nas Tabelas 3 e 5 a absorção e a fixação de cálcio e fósforo são proporcionais aos teores desses minerais nas varias rações e comparáveis aos obtidos com o cálcio e fósforo da mistura salina, nos grupos contendo caseína. As diferenças observadas entre os grupos C₁, T₁ e S₁ e, entre os grupos C₂, T₂ e S₂, quanto aos totais de cálcio e de fósforo utilizados, devem-se às diferenças no crescimento dos animais, causados pela variação dos teores proteicos (10 e 20%) e, também, às pequenas variações observadas nos teores dos minerais nas rações.

Nas rações S e T, que não receberam suplementação com mistura salina e, onde os minerais contidos nos CPP eram a única fonte de macro e microelementos essenciais, o aproveitamento percentual do cálcio e do fósforo foi elevado, quando comparado ao das rações suplementadas ($P < 0,01$), em função do baixo teor na ração, evidenciando a sua alta possibilidade de utilização. Nessas rações, a digestibilidade do cálcio e do fósforo foi, respectivamente, de cerca de 72% e 71% para a tilápia e de 79% e 82% para a sardinha. Na mesma ordem, o aproveitamento biológico (retenção percentual do ingerido) foi de 63% e 74% para tilápia e de 51% e 65% para a sardinha.

Os valores menores, observados para sardinha, refletem as diferenças entre as rações S e T quanto aos teores de minerais: como os concentrados de sardinha são menos ricos em minerais, houve apenas uma tendência à maior absorção para satisfazer às necessidades totais de crescimento.

Os nossos resultados confirmam os de outros autores^{(2) (3) (4) (5)}, referentes à boa utilização do cálcio e do fósforo nos CPP e indicam uma deficiência na fração mineral que poderia ser de oligoelementos essenciais, ou de minerais como o potássio, importantes no aproveitamento de proteínas. A deficiência de potássio parece ser mais provável tendo em vista os trabalhos de DUBRUYN e DREYER⁽²⁰⁾ os quais observaram, que a suplementação com potássio acarretava o desaparecimento de deficiência no crescimento de animais alimentados com rações contendo 4,4% de minerais exclusivamente originados de concentrados proteicos de peixes.

A fixação do flúor foi também estudada em condições óti-

mas e sub-ótimas de proteínas (10 e 20%), bem como de minerais (suplementação com mistura salina ou não), condições essas que poderiam existir em localidades onde houvesse deficiências na alimentação.

Na Tabela 4 encontram-se os resultados do balanço de flúor obtidos durante as 4 semanas experimentais. Pode-se verificar pela tabela que o flúor é absorvido e utilizado e essa fixação nos dentes, pode explicar, pelo menos em parte, o efeito anticariogênico do CPP, observado por vários autores^{(6) (7) (8) (9) (10)}.

De qualquer forma, a fixação é pequena, cerca de 18-22% do ingerido (Tabela 5), o que confirma os resultados de ZIPKIN e col.⁽¹⁴⁾, que encontraram um aproveitamento de 24, 17 e 13% em rações contendo respectivamente 20, 50 e 80 ppm de F de CPP. Também LEE e NILSON⁽²¹⁾, obtiveram para o flúor de salmão e da cavala baixa utilização, da ordem de 20-25%.

Possivelmente o flúor contido nos ossos de peixe, sob a forma de fluoroapatita, é menos aproveitável do que sob outras formas químicas, como o NaF, afirmação que encontra apoio no trabalho de McLURE⁽²²⁾.

Dentro dos limites por nós estudados a nas dietas isomine-rais, contendo os CPP, a fixação segue a equação ($P < 0,01$) $Y = 0,0672X + 0,202$, onde $y =$ mg de flúor fixado na carcaça e $X =$ ppm do elemento na ração.

Pelas Tabelas 4 a 5 pode-se verificar que, entre as rações isominerais contendo CPP, a quantidade total do flúor, fixada pela carcaça dos animais submetidos às rações T_2 e S_2 , é quase o dobro do total fixado pelos animais submetidos às rações correspondentes T_1 e S_1 , sendo, portanto, proporcional aos teores do halogênio na ração. Essa proporcionalidade não é verificada na absorção que, como se vê pela Tabela 5, em ambos os grupos parece fixa e é da ordem de 30-40% do ingerido.

Esse resultados indicam que a absorção do flúor é regulada pela absorção de outros minerais, possivelmente pela absorção ou necessidade de cálcio. A partir da ração T_1 por exemplo, que continha 27,73 ppm de flúor, foram absorvidos 3.158 mg correspondendo a 32,68% do ingerido; a partir da ração T_2 , que continha o dobro, ou seja, 53,84 ppm do halogenio foram absorvi-

das 7.468 mg representando o dobro do caso anterior mas uma percentagem de absorção semelhante de 38,35%. O pequeno aumento na percentagem de absorção para a ração T_2 foi possivelmente devido ao maior crescimento dos animais, já que essa ração tinha 20% de proteína:

A eliminação urinária foi diferente os ratos submetidos a ração T_1 eliminaram urina com 454 ppm de flúor contra 1130 para aqueles submetidos a ração T_2 .

Possivelmente, não existe uma "homeostase" rígida ou quantidade limite de flúor, que é fixado, pois, apesar da excreção urinária aumentar com o aumento do total absorvido (Tabela 4) os teores fixados na carcaça aumentam proporcionalmente, sendo que a excreção urinária consegue reduzir de apenas 10% a percentagem do flúor absorvido que foi fixada nos grupos "2" em relação aos grupos "1".

Comparando por exemplo as rações T e T_1 verifica-se que para a ração não suplementada a percentagem de flúor absorvido foi maior (55,96% contra 32,68%) e essa maior absorção acompanha a maior absorção de cálcio (72,37% contra 47,50%). O mesmo pode ser dito em relação às rações S x S_1 . O mesmo comportamento foi observado para rações S_2 quando comparada à S_1 .

Os animais submetidos às rações T e S, não suplementadas com minerais, em virtude de uma deficiência salina cresceram menos, daí o total fixado de cálcio e fósforo ser menor, mas a absorção percentual aumentou em função dos menores teores desses minerais na ração, o que causou também um aumento de 2 vezes na absorção do flúor (Tabela 4 e 5) e uma conseqüente maior fixação na carcaça.

Esses resultados permitem explicar aqueles obtidos por SPENCER⁽¹⁵⁾ que obteve, em humanos, uma elevada absorção do flúor de CPP, mas em dietas pobres em cálcio e os de ZIPKIN e col.⁽¹⁴⁾, que usavam rações com teores minerais elevados.

E oportuno lembrar aqui que os resultados da fixação obtidos com as rações de caseína, são totalmente comparáveis com os obtidos com os CPP, pois são compostos diferentes de flúor que estão presentes em cada caso e além disso os teores do halogênio são diferentes.

De qualquer forma, supondo-se um consumo diário de 20 g do concentrado, teríamos a ingestão de 4,6 mg de flúor da Tilápia e 1,6 mg da sardinha mas a utilização de apenas 20% ou seja no máximo 0,96 mg; dose que não causa esmalte manchado⁽²²⁾

Por outro lado, na ingestão de dietas pobres em minerais as doses acima seriam dobradas e, talvez, houvessem riscos apenas em regiões com elevados teores de flúor na água de baixa dureza. Acreditamos que o trabalho recente de STILLINGS e col.⁽²³⁾ confirma o que dissemos.

Pelo menos no caso de dietas normais, não parece haver necessidade de reduzir o teor do halogênio nos concentrados até 100 ppm, como exige o FDA⁽¹²⁾.

CONCLUSÕES

O cálcio e o fósforo contidos em concentrados proteicos (CPP) de Sardinha e de Tilápia são bem absorvidos e utilizados por animais jovens. Todavia, a fração mineral, como um todo, apresenta deficiência qualitativa ou quantitativa, tornando-se insuficiente para a manutenção do crescimento.

A absorção do flúor bem como a sua fixação, e baixa, o que fala em favor de uma ação benéfica como proteção contra cárie dental dos CPP; devido a isso, não parece que possam advir efeitos tóxicos pela sua ingestão.

A fixação em mg(Y) depende da concentração de flúor na ração em ppm (X), segundo a equação $Y = 0,0672X + 0,202$.

A equação é válida para dietas isominerais. Em casos de deficiência mineral na ração, a fixação do halogênio aumenta proporcionalmente à severidade da deficiência.

Os teores de cálcio, na ração, limitando a absorção do flúor parecem mais importantes que a eliminação urinária do halogênio na determinação da sua fixação no organismo.

Para dietas normais, não parece haver necessidade de reduzir os teores de flúor dos CPP.

SUMMARY

BROMATOLOGICAL STUDY OF CONCENTRATE FROM *SARDINELLA AURITA* AND *TILAPIA MELANOPLEURA*. II. BIOLOGICAL AVAILABILITY OF CALCIUM, PHOSPHORUS AND FLUORIDE.

The calcium and phosphorus of f

The calcium and phosphorus of fish protein concentrates (FPC) prepared from whole sardines or tilapias have high biological availability, but the mineral fraction as a whole did not support the normal growth of young rats.

Fluoride absorption and utilization is low; the amount retained in the carcass of rats depends on the amount given in the diet according to the equation:

$$Y = 0,0672X + 0,202$$

Y = mg of fluorine retained

X = ppm of fluorine in the diet

In case of sub-optimal levels of mineral ingestion, fluoride fixation increased proportionally to the deficiency.

Our results demonstrate that does not seem necessary to reduce de amount of fluoride in FPC intended for human consumption, at least for people without mineral deficiency in the diet.

Results concerning the Ca, P and F balance in rats are presented.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. 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**:409-416, 1957.
2. BASU, K. P. et al. 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**:417-422, 1942.
3. LEVERTON, R. M. & PAYAWAL, S. M. The physiological availability of calcium, phosphorus and nitrogen from the bones and flesh of dills, a small fish used in Filipino diet. *Philippine J. Sc.*, Manila, **80**:23-32, 1951. Apud: *Nutr. Abstr. Rev.*, Aberdeen, **22**:175, Abstr. 892, 1952.
4. 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**: 147-156, 1964.

5. SHURPALEKAR, S. R. et alii. The effect of a supplementary protein food containing fish flour (from oil sardine) on the metabolism of nitrogen, calcium and phosphorus in children. **Indian J. Pediat.** Mysore, **30:272-275**, 1963.
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, **37:419-421**, 1958.
7. OPUSZINSKA, T. Badania and Rola maozkirybnej w profilaktycs-prochnicy Zebow u Bialycg Szczurow. **Roczniki Panstwowego Zakladu Hig.**, Warszawa, **17:289-295**, 1966.
8. 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, pg. abstr. 100.
9. STEPHAN, R. M. Effects 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.
10. CHAYET, C. et alii. Efecto de la harina de pescado de consumo humano. (unicef-Chile-Quintero) sobre la caries experimental en la rata blanca. **Nutrici3n Bromatol. Toxicol.**, Santiago de Chile, **5:20-24**, 1966.
11. NIZEL, A. E. et alii. The effect of feeding fish protein concentrate (FPC) in different amounts on caries development in rats. INTERNATIONAL ASSOCIATION DENTAL RESEARCH, 47 th. General Meeting. Houston, march, 1969. **Program and abstracts of papers**. Chicago, 1969, p. 65, abstr. 97.
12. 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. **32:1174**, 1967.
13. Boletim da G.A.P. **4:50**. 1975.
14. ZIPKIN, I. e col. Biological availability of the fluoride of fish protein concentrate in the rat. **J. Nutr.**, **100:293-301**, 1970.
15. SPENCER, H. D. e col.. Availability of fluoride from fish protein concentrate and from sodium fluoride in man. **J. Nutr.**, **100:415-422**. 1970.
16. LAJOLO, F. M. e col. Estudo bromatol3gico de concentrados proteicos obtidos a partir da *Sardinella Aurita* e da *Tilapia Melanopleura*. I. Ensaio das prote3nas. **Arch. Lat. Amer. de Nutr.**, **25:67-78**, 1975.
17. FERRO, P.V.A.S. & HAM, A. N. Colorimetric determination of calcium by chloranilic acid. II. A semimicro method with reduced preci-

18. pitation time. **Am. J. Clin. Path.**, Baltimore, **28**:698-692, 1957.
18. FISKE, C. H. & SUBAROW, U. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, **66**:375-400, 1925.
19. ZUCAS, S. M. & LAJOLO, F. M. Frascos de difusão para o isolamento de pequenas quantidades de flúor. **Rev. Fac. Farm. Bioquim. S. paulo**, **6**:33-34, 1968.
20. DUBRUYN, D. B. & DREYER, J. J. Studies on the nutritive value of the mineral components of a Sout-African fish flour, with special reference to the effect of supplementation with potassium. **Proc. Nutr. Soc. S. Afr.**, Pretoria, **2**:59-68, 1961.
21. LEE, C. F. & NILSON, H. W. Study of the metabolism of naturally cocuring fluorine in canned salmon and mackerel, Washington D. C., V. S. Depto of Commerce Bureau of Commercial Fisheries, 1939, 15p/Investigational Report n^o. 44.
22. McLURE, 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**:159-170, 1945.
23. STILLINGS, B. e col. Further studies on the availability of the fluoride in fish protein concentrate. **J. Nutr.**, **103**:26-35, 1973.