

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
Diretor: Prof. Dr. João Soares Veiga

I) ESTUDO COMPARATIVO SÔBRE A APLICABILIDADE DOS MÉTODOS DO ÓXIDO CRÔMICO E CONVENCIONAL PARA A AVALIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE APARENTE NO RATO ALBINO

(COMPARATIVE STUDY ON THE APPLICABILITY OF THE CHROMIC OXIDE AND CONVENTIONAL METHODS IN DETERMINING THE APPARENT DIGESTIBILITY IN ALBINO RAT)

II) ÍNDICES DE RETENÇÃO DO NITROGÊNIO, CÁLCIO E FÓSFORO DE RAÇÃO COMERCIAL, BALANCEADA (*Dog Meal*)*

(RETENTION INDEXES OF NITROGEN, CALCIUM AND PHOSPHORUS OF COMMERCIAL, BALANCED RATION [DOG MEAL])*

FERNANDO ANDREASI
Assistente

Inúmeras investigações têm sido feitas sôbre a possibilidade de se utilizar o óxido crômico como substância índice em estudos de digestibilidade nas espécies de interêsse econômico.

Uma das maiores dificuldades que se apresentam, relacionadas com êsses estudos, ao utilizar o método convencional, refere-se à identificação dos residuos da ração que se propõe investigar.

Êste problema poderia ser superado adotando-se as chamadas substâncias índices, bastando para isso estabelecer relações quanto ao teor do indicador no alimento e nas fezes, desde que essa substância seja absolutamente inerte e, conseqüentemente, eliminada quantitativamente, pelas fezes.

* Trabalho realizado graças à deferência especial da Rockefeller Foundation.

A parte experimental foi executada no Departamento de Bioquímica da Universidade de Cornell (Ithaca). A fase analítica foi procedida, parte no mesmo Departamento e, parte no Departamento Federal de Nutrição, situado na área da Universidade referida. As determinações do valor calórico foram executadas no Departamento de Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

Considerável número de experimentadores tem utilizado, em várias espécies, o óxido crômico como substância índice na avaliação da digestibilidade.

HAMILTON e colabs. (1927-28), BARNICOAT (1942-45) [cit. LLOYD (1952)], KANE e colabs. (1950-52), HARDISON e REID (1953), JARL (1946-50), COUP (1950), LLOYD (1952), ARMSTRONG e colabs. (1954), trabalhando com ovinos e bovinos, de modo quase geral, fizeram algumas restrições ao emprego do óxido crômico.

BARNICOAT (1942-45) [cit. LLOYD (1952)], SCHÜRCH e colabs. (1952), NORDFELDT (1946), LLOYD (1952), por sua vez, preconizaram o uso do óxido crômico na espécie suína.

No homem, também, foi utilizado esse indicador com resultados satisfatórios por EDIN e colabs. (1944) [cit. LLOYD (1952)], IRWIN e CRAMPTON (1951).

LLOYD e McCAY (1954-55) obtiveram sucesso ao usar o método do óxido crômico na espécie canina.

OLSSON (1950) e DANSKY e HILL (1952) adotaram essa substância índice, nas aves.

SCHÜRCH e colabs. (1950) e LLOYD (1952) sugeriram a adoção do óxido crômico na determinação da digestibilidade da matéria seca de dietas destinadas a ratos. Exames post-mortem de 10 ratos utilizados na experimentação realizada por este último autor, revelaram a completa inocuidade da administração da substância índice, inocuidade esta evidenciada pela apresentação normal dos diversos órgãos examinados (pulmão, coração, estômago, baço, fígado e intestino).

CARROLL e colabs. (1952), utilizaram, no rato, o método do óxido crômico para avaliar a absorção do nitrogênio, no tracto intestinal.

O presente trabalho objetivou estudar a aplicabilidade do método do óxido crômico para a avaliação da digestibilidade aparente de ração administrada a ratos, visando, em seguida, confrontá-lo com o método chamado convencional.

MATERIAL E MÉTODO

1 — *Animais e gaiolas* — Empregamos para este estudo, ratos albinos, os quais compreendiam quatro animais adultos, cuja idade era de um ano e quatro meses — dois machos e duas fêmeas — e, quatro jovens, cuja idade variava de 43 dias a 47 dias, também, dois machos e duas fêmeas. Para efeito de identificação, na tabela I figuram os dados relativos aos animais estudados.

Tabela I — Características dos ratos albinos utilizados no experimento.

Rato nº	Idade (dias)	Sexo	Pêso vivo* (g)	Classificação	Nº da colônia
1	489	Fêmea	229	Adulto	372
2	489	Fêmea	271	Adulto	369
3	484	Macho	411	Adulto	391
4	479	Macho	373	Adulto	400
5	47	Macho	204	Jovem	887
6	47	Fêmea	172	Jovem	888
7	43	Macho	208	Jovem	898
8	43	Fêmea	161	Jovem	894

* Média de três pesadas semanais.

Os ratos foram colocados em gaiolas especiais, providas de piso constituído de bastões de vidro dispostos paralelamente, de modo a permitir a passagem das fezes. A gaiola, de forma cilíndrica, descansava sobre o piso. Abaixo d'êste adaptava-se um funil de vidro cuja parte afilada era provida de tela de malhas finas destinada a conter as fezes. A urina excretada passava através da tela e era recolhida em vidro colocado na extremidade do colo do funil. Destarte, urina e fezes eram separadas.

2 — *Ração* — Os ratos foram alimentados com mistura comercial, balanceada, conhecida pela denominação de "Dog Meal".

Na tabela II são apresentados os resultados relativos à composição química da ração, obtidos mediante o emprego de métodos analíticos, que serão apresentados posteriormente.

Tabela II

Matéria seca	Composição química da mistura sobre matéria seca (em porcentagem)								
	Nitrogênio	Proteína	Extracto etéreo	Carboidratos	Cinzas	Matéria orgânica	Cal./100 g	Óxido crômico	R. N.
92,88	4,57	28,62	15,50	46,59	9,29	90,71	457,00	1,08	1:3,1

3 — *Preparo e administração da ração* — Durante o período de ajustamento, que durou sete dias, os ratos foram alimentados “ad libitum”, com a finalidade de os habituar à nova ração. Em seguida, foi adicionado o óxido crômico à mistura, nas condições seguintes:

- 1) Secámos a mistura em estufa a 103°C durante 24 horas e inferimos o teor da matéria sêca, cujo resultado, média de duas determinações, foi de 91,7%.
- 2) Pesamos 4 quilogramas da mistura úmida, à qual adicionamos 36,7 g de óxido crômico. Obtivemos assim a proporção aproximada, de 1% de óxido crômico sôbre a matéria sêca da ração.
- 3) A fim de homogenizar adequadamente os componentes da mistura, utilizamos um misturador elétrico (Hobart Mixer Model S-601) durante 25 minutos.
- 4) Colocamos a mistura total em recipiente apropriado, provido de rolha com rosca.

Dêste modo, preparamos a mistura, munida de indicador, para alimentar os ratos durante os períodos preliminar e de colheita.

Durante o período da colheita, amostras da ração foram tomadas e reunidas em recipiente para análise ulterior.

Água destilada foi oferecida aos animais “ad libitum”.

A administração da ração contendo o indicador foi observada durante o período preliminar — 3 dias — findo o qual iniciou-se a fase de colheita, cuja duração foi de 18 dias.

4 — *Fezes* — Diariamente as fezes eram colhidas, cuidadosamente, e transferidas para vidros individuais aos quais juntava-se mistura de álcool a 70% e ácido clorídrico em quantidade suficiente para cobrir as fezes. Durante os intervalos da colheita e precedendo à análise, os vidros permaneciam em geladeira.

Ao término da colheita, as fezes foram transferidas para cápsulas grandes, de fundo chato, de pêsco conhecido e mantidas na estufa a 65°C durante 3 dias.

Procedeu-se em seguida à moagem das fezes em almofariz de louça, até obtenção de amostra fina e homogênea.

Por último, foram removidas para recipientes especiais e conservadas à temperatura ambiente, durante 48 horas, a fim de se estabelecer equilíbrio com a umidade do ar.

Na tabela III figuram os valores referentes à composição das fezes.

Tabela III

Composição química das fezes (Sôbre matéria sêca, em porcentagem)									
Rato n°	Matéria sêca	Nitrogênio	Proteína (N x 6,25) (Prôtidos)	Extracto etéreo (Lipidos)	Carboidratos (Glicidos)	Cinzas	Matéria orgânica	Cal./100 g	Cr ₂ O ₃
1	89,11	4,48	28,02	11,88	33,34	26,76	73,24	371,75	4,06
2	89,97	4,72	29,53	10,58	34,46	25,43	74,57	383,10	4,24
3	90,76	4,71	29,49	8,58	35,50	26,43	73,57	366,00	4,23
4	89,69	4,25	26,55	12,50	35,06	25,89	74,11	368,60	4,22
5	89,57	4,72	29,54	10,54	36,43	23,49	76,51	365,43	4,59
6	88,64	4,53	28,35	11,47	35,63	24,55	75,45	365,35	4,49
7	88,94	4,78	29,87	11,47	35,04	23,62	76,38	378,43	4,53
8	89,27	4,48	28,03	10,95	36,53	24,49	75,51	352,15	4,37

MÉTODOS ANALÍTICOS

As determinações de nitrogênio, matéria sêca, extracto etéreo e cinzas foram procedidas segundo os métodos A.O.A.C. (1945).

Como não determinamos os componentes da fração carboidratos, êstes foram obtidos por diferença.

O valor calórico do alimento e fezes foi obtido em bomba calorimétrica, modelo Berthelot.

O óxido crômico foi obtido segundo o método modificado por SCHÜRCH, LLOYD e CRAMPTON (1950).

RESULTADOS

Na tabela IV encontram-se os resultados relativos aos coeficientes de digestibilidade aparente, obtidos através do emprêgo dos métodos convencional e do óxido crômico.

Tabela IV — Coeficiente de digestibilidade aparente dos componentes da mistura, determinado pelos métodos convencional e do óxido crômico (sobre matéria sêca, em porcentagem).

Rato n°	Convencio- nal	Óxido crômico	Convencio- nal	Óxido crômico	Convencio- nal	Óxido crômico
	Matéria sêca		Proteína		Extracto etéreo	
1	76,9	74,5	77,4	74,0	82,3	79,6
2	75,6	75,3	74,8	73,7	83,3	82,6
3	76,1	75,0	75,4	73,7	86,8	85,9
4	76,3	75,3	78,0	76,3	80,9	79,4
5	77,2	77,3	76,4	75,7	84,5	84,0
6	78,1	77,0	78,3	76,2	83,8	82,2
7	77,7	77,2	76,8	75,1	83,5	82,4
8	78,5	76,2	78,9	75,8	84,8	82,5
Média (x)	77,0	76,0	77,0	75,0	83,7	82,3

Rato n°	Conven- cional	Óxido crômico	Conven- cional	Óxido crômico	Conven- cional	Óxido crômico	Conven- cional	Óxido crômico
	Carboidratos totais		Cinzas		Matéria orgânica		Calorias	
1	83,5	81,0	33,4	23,4	81,3	78,5	81,2	78,4
2	82,0	81,2	33,2	30,3	79,9	79,1	79,5	78,6
3	81,8	80,5	32,1	27,4	80,6	79,3	80,9	79,5
4	82,2	80,7	33,9	28,7	80,6	79,1	80,9	79,4
5	82,1	81,6	42,3	40,5	80,7	80,1	81,7	81,2
6	83,3	81,6	42,2	36,4	81,8	80,0	82,5	80,8
7	83,3	82,1	43,4	39,4	81,3	79,9	81,6	80,3
8	83,1	80,6	43,3	34,8	82,1	79,4	83,4	81,0
Média (x)	82,7	81,2	38,0	32,6	81,0	79,4	81,5	79,9

A análise estatística dos resultados referentes à matéria sêca — teste *t* de Student (PATERSON, 1939) — revelou que as diferenças verificadas entre os métodos convencional e óxido crômico são significantes estatisticamente.

Por seu turno, as diferenças assinaladas entre idades, mostraram-se estatisticamente, significantes, ou, em outras palavras, os animais jovens aproveitaram mais acentuadamente a matéria seca da ração. O coeficiente de variabilidade médio verificado para ambos os métodos utilizados, foi da ordem de 1,16%.

No que diz respeito à proteína, a interpretação estatística dos resultados assinalou diferenças significantes entre os métodos, porém, as discrepâncias surpreendidas entre idades foram atribuídas legitimamente ao acaso. Os coeficientes de variabilidade foram de 1,86% e 1,48% para os métodos convencional e do óxido crômico, respectivamente.

No que concerne ao extracto etéreo, as diferenças obtidas são também significantes, quer no que se relacionam aos métodos, quer ainda referentes à idade. Deve-se destacar que os coeficientes de variabilidade observados em ambos os métodos foram da ordem de 2,09% para o convencional e 2,59% para o método do óxido crômico.

O componente carboidrato apresentou diferenças entre métodos, julgadas estatisticamente significantes, porém, tal não ocorreu no concernente ao fator idade. Assinale-se também, que a variabilidade encontrada fôra devéras baixa, ou seja, de 0,85% para o método convencional e de 0,70% para o óxido crômico.

Como reflexo dos achados relativos aos mais componentes da matéria orgânica, esta revelou diferenças, estatisticamente significantes, não somente em relação aos métodos, como também em função da idade dos animais. A variabilidade consignada para este componente foi de 0,89% e 0,69% para os métodos convencional e do óxido crômico, respectivamente.

O componente da ração representado pelas cinzas mostrou resultados cujas diferenças entre métodos e idade são altamente significantes. Os animais jovens digeriram cerca de 30% mais cinzas do que os adultos para o método convencional, enquanto para o óxido crômico os adultos aproveitaram cerca de 38% menos do que os jovens. O coeficiente de variabilidade calculado foi de 13,68% para o convencional e de 18,71% para o óxido crômico.

As calorias digeríveis também preponderaram favorável e estatisticamente para os animais jovens ao mesmo passo que as diferenças assinaladas entre métodos foram significantes. Nos moldes registrados para os outros constituintes da ração, as calorias mostraram também variabilidade baixa, ou seja, de 1,45% para o método convencional e de 1,35% para o óxido crômico.

Com o intuito de evidenciarmos, à saciedade, uma das condições que devem caracterizar as substâncias índices, qual seja a de ser completamente indigerível e, portanto, não absorvível, calculámos a recuperação do óxido crômico, cujos resultados são vistos na tabela V.

Tabela V — Prova de recuperação do óxido crômico.

Rato n°	M.S. consumida total (g)	M.S. excretada total (g)	Óxido crômico		
			Ingestão total (g)	Excreção total (g)	Recupera- ção (%)
1	183,9	42,5	1,99	1,72	86,43
2	231,3	56,4	2,50	2,39	95,60
3	261,9	62,5	2,83	2,64	93,29
4	291,6	69,1	3,15	2,92	92,70
5	265,6	60,6	2,87	2,78	96,86
6	231,3	50,6	2,50	2,27	90,80
7	284,2	63,2	3,07	2,86	93,16
8	201,5	43,4	2,18	1,90	87,15

A diferença verificada entre a porcentagem de recuperação média — 92,0% — e o valor teórico — 100,0% — revelou-se ser estatisticamente significativa ou, em outras palavras, as variações observadas são atribuíveis a algum fator ou fatores que teriam determinado essas diferenças.

A variabilidade de 3,85% consignada na prova de recuperação, demonstra que houve variações individuais mais acentuadas na capacidade de eliminação da substância índice.

Por outro lado, as diferenças verificadas entre sexos e a possível "inter-ação" entre métodos e idade não se mostraram significantes para todos os nutrientes.

DISCUSSÃO

SCHÜRCH, LLOYD e CRAMPTON (1950) ao estudarem a aplicabilidade do método do óxido crômico à determinação da digestibilidade da matéria seca, utilizaram ratos de idades não referidas, de sorte que menção não é feita com relação ao comportamento do fator idade face à digestibilidade da ração empregada.

Nossos achados relativos à matéria seca destacaram o fato que as diferenças observadas foram estatisticamente significantes com referência não somente aos métodos como também no concernente à idade. De fato, os jovens digeriram, em média, 77,4% da matéria seca, enquanto os adultos aproveitaram-na ao nível de 75,6%. É interessante assinalar a baixa variabilidade obtida, ou seja, de 1,32% e 1,43% para os adultos e jovens, respectivamente.

Aliás, SCHÜRCH e colabs. (1950) e LLOYD (1952), concluindo pela adoção segura do método do óxido crômico na determinação da digestibilidade da matéria seca, não fizeram quaisquer referências a propósito da idade dos indivíduos, como também, da porcentagem de recuperação da substância índice.

O teste *t* aplicado a todos os nutrientes que compõem a matéria seca indicou serem as diferenças estatisticamente significantes, em relação aos métodos. À simples inspeção da tabela IV verifica-se que o método convencional exhibe coeficientes ligeiramente mais elevados do que os apresentados pelo óxido crômico. Contudo, essa discrepância é bem evidente para as cinzas.

A significância das diferenças registrada na matéria seca conduziu, como é óbvio, à obtenção de idêntico resultado no cotejo estabelecido para a matéria orgânica e cinzas, visto que estes são os constituintes da matéria seca.

Destaque-se, contudo, a capacidade de aproveitamento mais acentuada apresentada pelos animais jovens no que se relaciona aos elementos constitutivos das cinzas, fato este que traduzido em números adjudicou, pelo método convencional, coeficientes de digestibilidade médios de 33,1% e 42,8% para os adultos e jovens, respectivamente.

Com relação ao óxido crômico, os dados respectivos são da ordem de 27,4% para os adultos e 37,8% para os jovens.

Aliás, a propósito, ANDREASI (1956) assinalou para a mesma raça em estudo e, administrada a cães, que os animais jovens têm capacidade mais pronunciada de digerir e aproveitar os componentes minerais. Este achado será corroborado na Segunda Parte deste trabalho, quando tratarmos do balanço dos elementos cálcio e fósforo.

Cumpramos ressaltar ainda o fato de que as amostras, oriundas de longo período de excreção — 18 dias —, eram representativas o que em parte explica o baixo coeficiente de variação obtido para a totalidade dos nutrientes estudados. LLOYD (1952) observou período preliminar de cinco dias seguido da fase de colheita cuja duração foi de

seis dias. Além disso, êsse autor colheu as fezes dos ratos emitidas de manhã, ao meio-dia e, à tarde, analisando-as, separadamente. As médias encontradas nos periodos referidos, foram exatamente iguais — 70% — diferindo ligeiramente daquela auferida pelo método convencional — 71% — com a qual foram comparadas. Entretanto, o coeficiente de variabilidade da matéria sêca encontrado pelo aludido autor, para o método convencional, foi de 4,2% e, para os três periodos — manhã, meio-dia e tarde — foram de 5,57%, 4,14% e 4,57%, respectivamente, em relação aos métodos do óxido crômico. Se compararmos agora, os valores obtidos por nós, verificaremos que a variabilidade calculada para o mesmo nutriente — matéria sêca — foi de 1,32% e de 1,43% para os métodos convencional e do óxido crômico, respectivamente. Por conseguinte, acreditamos que a não significância consignada por LLOYD, provávelmente devesse ser atribuída à grande variabilidade determinada pelo grupo heterogêneo de animais empregados. Por seu turno, algum fator ou fatores inerentes à ração, poderiam ser invocados para explicar a menor eliminação da substância índice de molde a oferecer resultados que não se identifiquem, estatisticamente, àqueles fornecidos pelo método convencional.

Das considerações expendidas, depreende-se que, dentro das normas estabelecidas neste trabalho, o método do óxido crômico utilizado na proporção de 1%, apresenta resultados sistematicamente mais baixos daqueles conferidos pelo método convencional clássico.

SEGUNDA PARTE

II — ÍNDICE DE RETENÇÃO DO NITROGÊNIO, CÁLCIO E FÓSFORO DA RAÇÃO

Como complemento ao estudo da digestibilidade referido na Primeira Parte dêste trabalho, propusemo-nos investigar, no rato albino, o aproveitamento dos elementos nitrogênio, cálcio e fósforo contidos na mistura comercial (Dog Meal).

a) *Apanhado bibliográfico*

NITROGÊNIO

A literatura, atinente ao assunto, é rica, principalmente, pela circunstância de que as provas visando a determinação do valor biológico

das proteínas foram, em sua maioria, executadas em rato como animal de experimentação.

No resumo bibliográfico que se segue, enumeraremos apenas os trabalhos que julgamos fundamentais.

Empregando ratos em seu trabalho, MITCHELL (1924a) reencetou os estudos que foram inaugurados por VOIT (1868) [cit. McCAY: 64 (1949)], objetivando estabelecer método para a determinação do valor biológico das proteínas. Seguiu-se outro trabalho de MITCHELL (1924b) que focaliza a importância dos diferentes níveis de ingestão no aproveitamento das proteínas, pelo rato albino.

No mesmo sentido, foram feitos estudos para a classificação dos aminoácidos essenciais e teôres necessários dos mesmos para o crescimento normal de ratos (ROSE, 1937).

ROSE e RICE (1939) e ROSE e colabs. (1948) situaram o papel de cada aminoácido essencial e não essencial na nutrição do rato, assim como fixaram as quantidades e as relações existentes entre os mesmos.

ARNRICII e colabs. (1951), em ratos, examinaram seis proteínas, parcialmente purificadas e determinaram a retenção do nitrogênio conferido pelas mesmas. Exceção feita a uma dieta — gluten — relação linear foi verificada, nos jovens, entre os ganhos em pêso por grama de nitrogênio ingerido.

CÁLCIO E FÓSFORO

O rato tem sido utilizado como animal de escolha para estudos visando conhecer o papel do cálcio e fósforo no desenvolvimento do esqueleto.

Assim é que MEDES (1926), HAAG e PALMER (1928), CAMPBELL e colabs. (1935), DUYNE e colabs. (1941) referiram-se aos teôres de cálcio e fósforo na dieta para ratos, e sua fixação no organismo.

NICOLAYSEN (1937) investigou o papel da vitamina D na razão, enquanto HALDI e colabs. (1939) esclareceram a influência exercida pelos teôres empregados de cálcio e fósforo na dieta sôbre a excreção dos mesmos pelos emunctórios. BERGEIM (1926) apresentou alguns resultados sôbre a presença de substância anti-raquítica na dieta e sua influência na absorção do cálcio e fósforo em diferentes porções do tracto intestinal.

A relação cálcio-fósforo na dieta para ratos foi abordada por TISDALL e DRAKE (1938).

Em três experiências envolvendo 76 ratos, LAWRENZ e MITCHELL (1941), relacionaram os teores desses dois elementos na dieta com o peso do esqueleto e com a ulterior proporção em que os mesmos eram encontrados nos ossos.

LOVELACE e colabs. (1950) ao adicionarem o oxalato à ração para ratos, ração que continha níveis adequados de cálcio, ressaltaram a influência do fator idade no aproveitamento do cálcio na dieta.

ADOLPH e LIAN (1941) concluíram de seus dados, que a crença muito arraigada atribuindo às secreções normais do tubo gastro-intestinal, a responsabilidade do aparecimento de grandes quantidades de cálcio, fica desmentida, pelo menos no que diz respeito ao rato. Em provas de balanço, em ratos, alimentados com dietas desprovidas de cálcio, verificaram que o cálcio total das fezes por 100 g de peso corporal equivalia a somente 0,6 mg por dia.

DUCKWORTH (1941), introduziu na dieta grandes quantidades de fibra e verificou que o teor de 30% determinou redução do balanço do nitrogênio, porém, não interferiu na retenção do cálcio.

Estudos interessantes foram realizados por WALLACE e colabs. (1951), que ao empregarem o Ca^{45} , estudaram a excreção desse elemento nos vários segmentos do tracto intestinal. Os resultados indicaram que todos os segmentos do tracto participaram na excreção do cálcio, preponderando, entretanto, a eliminação pelo intestino delgado. Esta observação contraria a opinião mais aceita de que no intestino grosso predomina aquela eliminação.

b) *Determinação do balanço do nitrogênio, cálcio e fósforo, no rato*

MATERIAL:

Os ratos utilizados nos experimentos de digestibilidade, abordados na Primeira Parte deste trabalho, serviram para as provas de balanço.

1 — *Colheita de urina* — A urina individual, era colhida, diariamente, e transferida para recipientes contendo tolueno como conservador. Logo após a colheita era mantida em geladeira, onde permanecia até o momento da análise.

2 — *Preparo da urina para análise* — A fim de separar ligeiro resíduo de alimento que sempre a contamina, a urina foi filtrada em algodão de vidro.

Enquanto a determinação do nitrogênio foi procedida partindo diretamente do filtrado, os teores de cálcio e fósforo foram determinados da solução "A" para cuja obtenção observou-se a seguinte técnica:

Solução "A"

- 1) tomar volume de 50 ml do filtrado de urina, transferindo-o para bquer de 250 ml de capacidade;
- 2) juntar 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado — baixo teor de cobre — e 2 ml de ácido nítrico (1:1), destilado;
- 3) cobrir com vidro de relógio e levar ao banho a vapor até a redução apreciável do volume;
- 4) adicionar 0,5 ml de ácido sulfúrico uma vez mais e insistir no banho a vapor, por mais 4 horas;
- 5) após resfriar e acrescentar 2 ml de ácido nítrico (1:1), transferir o bquer para chapa aquecida, mantendo temperatura suave;
- 6) acrescentar 15 ml de ácido nítrico — volumes sucessivos — até obtenção de resíduo claro e denso;
- 7) levar o conteúdo do bquer quase à secura e, em seguida, tratar pela água oxigenada a 30% — duas gôtas de cada vez — até obter resíduo branco denunciando ausência de matéria orgânica;
- 8) retirar o vidro de relógio e intensificar a chama para eliminar totalmente os ácidos sulfúrico e nítrico;
- 9) tratar o resíduo com 20 ml de ácido clorídrico 2 N e dissolvê-lo em banho a vapor;
- 10) diluir ao volume de 50 ml (solução "A").

NOTA — É importante não permitir que o conteúdo do bquer atinja à secura em quaisquer das fases do processo.

3 — *Métodos analíticos* — O nitrogênio e o cálcio foram obtidos pelos métodos oficiais A.O.A.C. (*) (1945).

* Association Official Agricultural Chemists.

O fósforo foi determinado pelo método de FISKE e SUBBAROW (1925).

As análises da ração, fezes e urina, revelaram os resultados constantes da tabela VI.

Tabela VI — Composição química da ração, fezes e urina.

Rato n°	Sobre matéria seca (mg/100 g)						Urina		
	Ração			Fezes			N (mg/100 ml)	Ca (mg/100 ml)	P (mg/100 ml)
	N	Ca	P	N	Ca	P			
1	4570	1080	1190	4480	4860	4670	2920	14,80	173
2	4570	1080	1190	4720	4620	4110	3720	12,02	257
3	4570	1080	1190	4710	4860	4360	4930	13,96	321
4	4570	1080	1190	4250	4270	4270	1240	14,87	89
5	4570	1080	1190	4720	4270	3850	3760	6,56	245
6	4570	1080	1190	4530	4320	3900	4720	14,34	366
7	4570	1080	1190	4780	4110	3610	2820	14,37	216
8	4570	1080	1190	4480	4480	3800	4690	14,80	315

RESULTADOS

Os valores relativos aos balanços de nitrogênio, cálcio e fósforo, são vistos nas tabelas VII, VIII e IX.

Tabela VII — Balanço do nitrogênio.

Rato n°	Peso vivo (g)	mg/100 g p.v./dia						Retenção (%)
		Ingerido	Excretado			Balanço	Proteína fixada (N×6,25)	
			Fezes	Urina	Total			
1	229	204	46	124	170	+ 34	212	16,7
2	271	217	55	111	166	+ 51	319	23,5
3	411	162	40	74	114	+ 48	300	29,6
4	373	198	44	135	179	+ 19	119	9,6
5	204	330	78	131	209	+121	756	36,7
6	172	341	74	126	200	+141	881	41,3
7	208	347	81	154	235	+112	700	32,3
8	161	318	67	145	212	+106	662	33,3

Tabela VIII — Balanço do cálcio.

Rato nº	Peso vivo (g)	mg/100 g p.v./dia				Balanço	Retenção (%)
		Ingerido	Excretado				
			Fezes	Urina	Total		
1	229	48	50	1	51	- 3	- 6,2
2	271	51	53	0	53	- 2	- 3,9
3	411	38	41	0	41	- 3	- 7,9
4	373	47	44	2	46	+ 1	+ 2,1
5	204	78	70	0	70	+ 8	+10,2
6	172	81	70	0	70	+11	+13,6
7	208	82	69	1	70	+12	+14,6
8	161	75	67	0	67	+ 8	+10,7

Tabela IX — Balanço do fósforo.

Rato nº	Peso vivo (g)	mg/100 g p.v./dia				Balanço	Retenção (%)
		Ingerido	Excretado				
			Fezes	Urina	Total		
1	229	53	48	7	55	- 2	- 3,8
2	271	56	48	8	56	0	0
3	411	42	36	5	41	+ 1	+ 2,4
4	373	52	44	10	54	- 2	- 3,8
5	204	86	64	8	72	+14	+16,3
6	172	89	64	12	76	+13	+14,6
7	208	90	61	12	73	+17	+18,9
8	161	83	56	10	66	+17	+20,5

DISCUSSÃO

NITROGÊNIO

Da tabela VII verifica-se que os animais adultos e jovens assimilaram 19,8% e 35,9%, respectivamente, do nitrogênio disponível na ração.

O nível de ingestão observado, por 100 g de rato, foi deveras uniforme, maximé se considerarmos os animais jovens (n.ºs 5, 6, 7, 8).

Por outro lado, as variações de retenção do nitrogênio, nos ratos em crescimento, foram menos acentuadas (12,75%). A comparação estabelecida entre os dados relativos aos animais adultos e jovens — teste *t* — apresentou resultados, considerados significantes, estatisticamente.

ESTREMER (1948) admitiu que as dietas encerrando 13,5% de proteína, foram tão eficazes para o desenvolvimento normal de ratos adultos, quanto aquelas nas quais o conteúdo de proteína era de 18%.

CAMPBELL e colabs. (1935) sugeriram a adoção de 16,7% de proteína e 14,5% de gordura.

Os níveis de 195 mg para os adultos e 334 mg para os jovens, de nitrogênio ingerido por 100 g p.v./dia, estabeleceram balanço positivo nitido.

Face a êsses resultados, conclui-se que, dentro dos limites restritos do experimento, ora apresentado, a proteína da dieta (Dog Meal) se revelou plenamente satisfatória para as necessidades plásticas de ratos albinos.

CÁLCIO E FÓSFORO

Na primeira parte dêste trabalho, tivemos oportunidade de referir que os animais jovens aproveitaram cerca de 33% — média dos dois métodos — mais cinzas do que os ratos adultos. Ora, se tal discrepância no aproveitamento das cinzas foi evidenciada, eram de se prever reflexos dêsse fato no balanço dos citados elementos. Realmente, se nos reportarmos aos dados contidos na tabela VIII, verificaremos que os ratos adultos (n.^{os} 1, 2 e 3) apresentaram percentagens de retenção de cálcio negativas; enquanto que os jovens retiveram, em média, 12,3% do cálcio ingerido.

Por seu turno, o fósforo (tabela IX) apresentou balanço negativo para os ratos adultos (1 e 4), perfeito equilíbrio para o rato n.^o 2, e ligeiramente positivo para o de n.^o 3. Os jovens, todavia, revelaram balanço positivo, 17,6% em média, o que aliás era previsto, em face dos achados consignados na digestibilidade das cinzas.

MEDES (1926) assinalou que ratos submetidos à dieta normal encerrando 302 mg de fósforo e 414 de cálcio por 100 g da dieta apresentaram não somente imagem normal dos ossos examinados ao raio X como também mostraram teores adequados dêsses elementos minerais através da análise dos ossos. Apenas os animais que receberam ração de baixo teor em fósforo, revelaram raquitismo. Essa asserção é corroborada por BERGEIM (1926).

DUYNE e colabs. (1941), por sua vez, preconizaram para o rato, níveis mínimos de 0,64% na ração sêca e, adiantaram que a proporção de 0,8% de cálcio está certamente dentro dos limites ótimos das necessidades dos animais.

CAMPBELL e colabs. (1935), por seu lado, admitiram que a relação cálcio-fósforo na dieta, é menos importante do que o fator quantitativo desses elementos.

Em situação diametralmente oposta, colocaram-se HAAG e PALMER (1928), quando afirmaram que o equilíbrio dos elementos cálcio, fósforo e magnésio na ração, constituia condição essencial para o crescimento normal de ratos. A ração basal utilizada pelos autores, era da ordem de 0,342% de cálcio e 0,648% de fósforo.

TISDALL e DRAKE (1938) focalizando a fixação dos elementos cálcio e fósforo no organismo, verificaram que no rato, a assimilação aumentada do cálcio é sempre acompanhada pelo fósforo que segue assim a mesma tendência.

Das referências feitas, deparam-se vários fatores que podem interferir na fixação do cálcio e fósforo.

Com relação às quantidades absolutas desses elementos na ração, aqui estudada, verificou-se que houve abundância dos mesmos à disposição dos animais, preenchendo desta forma as conclusões de MEDES (1926), DUYNE e colabs. (1941), e CAMPBELL e colabs. (1935). Por outro lado, a condição estabelecida por HAAG e PALMER (1928), em seu trabalho, fôra também satisfeita, uma vez que a relação cálcio-fósforo da ração por nós adotada foi da ordem de 1:1,1.

No que toca às considerações de TISDALL e DRAKE (1938), não nos fôra dado observar essa correlação positiva entre cálcio e fósforo, talvez motivado pelo número reduzido de animais aqui estudados. Contudo, a forma sob a qual estaria presente o cálcio na nossa ração seria, possivelmente, a responsável pelo baixo nível de aproveitamento desses minerais. ANDREASI (1955) ao trabalhar com cães e utilizando a mesma dieta, ora em estudo, atribuiu como uma das causas possíveis e determinantes do baixo grau de aproveitamento desses dois elementos, a natureza mineral inadequada presente na dieta.

Todavia, convém destacar, ainda, que o teor de vitamina D existente em nossa dieta — 0,075% — poderia também ser, parcialmente, responsabilizada pela assimilação deficiente dos elementos cálcio e fósforo.

Face aos valores consignados, podemos concluir que dentro das condições observadas neste trabalho, os níveis de ingestão médios de 46 mg

de cálcio e 51 mg de fósforo por 100 g de peso vivo e por dia, para os ratos adultos, não foram suficientes para estabelecer equilíbrio no balanço desses elementos. E, que os teores de 79 mg de cálcio e 87 mg de fósforo por 100 g de peso vivo e por dia, mostraram-se eficazes para as necessidades dos ratos jovens.

CONCLUSÕES

PRIMEIRA PARTE

1) O óxido crômico na proporção de 1,08% sobre a matéria seca, aplicado ao estudo da digestibilidade aparente de mistura comercial (Dog Meal), em ratos albinos e, comparado ao método convencional, apresentou diferenças julgadas, estatisticamente, significantes para todos os nutrientes examinados.

2) O fator idade fez sentir seus efeitos no aproveitamento da matéria seca e, conseqüentemente, da matéria orgânica e cinzas.

3) O fator sexo não se mostrou capaz de influenciar a digestibilidade de quaisquer dos nutrientes estudados.

4) A prova de recuperação do óxido crômico apresentou resultado — 92% — que comparado ao valor teórico — 100% — revelou incompleta eliminação da substância índice.

5) Os ratos jovens foram capazes de digerir cerca de 33% mais cinzas do que os adultos.

6) As calorias foram, também, mais acentuadamente, aproveitadas pelos ratos jovens.

SEGUNDA PARTE

1) Relativamente ao balanço do nitrogênio, os animais adultos e jovens retirando da ração, em média, 195 mg e 334 mg de nitrogênio por 100 g de p.v. e por dia, respectivamente, evidenciaram balanço positivo para esse elemento.

2) Confirmando os achados abordados na Primeira Parte deste trabalho e, relativos às cinzas, os animais adultos, ingerindo, em média, 46 mg de cálcio e 51 mg de fósforo por 100 g de peso vivo e por dia, não foram capazes de equilibrar as suas necessidades orgânicas para estes elementos.

3) Por outro lado, os ratos jovens, ingerindo, em média, 79 mg de cálcio e 87 mg de fósforo por 100 g p.v./dia apresentaram níveis de retenção da ordem de 12,3% e 17,6%, respectivamente.

RESUMO

O presente trabalho é dividido em duas partes, como segue:

PRIMEIRA PARTE

Ligeira revisão bibliográfica relativa ao emprêgo do óxido crômico como substância índice, precedeu o estudo sobre a aplicabilidade do mesmo, na determinação da digestibilidade dos nutrientes de mistura comercial — (Dog Meal) — ministrados a ratos albinos. Fez-se, ainda, comparação do aludido método com o convencional.

O óxido crômico administrado na proporção de 1,08% sobre a matéria seca, apresentou nível médio de eliminação de 92% e variabilidade de 3,85%.

O teste *t* de Student aplicado aos resultados, revelou-se, estatisticamente significativa para todos os nutrientes.

Os coeficientes de variabilidade observados para o método convencional foram bastante baixos, isto é, a amplitude verificada foi da ordem de 0,85% a 2,09% para todos os nutrientes, exceção feita às cinzas cuja variabilidade alcançou a cifra de 13,68%.

Da mesma forma, a amplitude apresentada pelo método do óxido crômico foi deveras reduzida, ou seja, de 0,69% a 2,59% considerando-se estas porcentagens como cifras limites entre as quais se situaram os dados referentes à variabilidade para todos nutrientes, exceção feita às cinzas, cuja variação foi de 18,71%.

O fator idade influenciou a digestibilidade da matéria orgânica, cinzas e calorias, pois que os animais jovens aproveitaram-nas em maior grau do que os ratos adultos. No entretanto, para o extrato etéreo, proteínas e carboidratos, tôdas as diferenças surpreendidas entre idades foram atribuídas, estatisticamente, ao acaso.

Diferenças de digestibilidade entre sexos não foram observadas, assim como não foi evidenciada “inter-ação” entre idade e métodos.

Seguindo a mesma tendência observada para os mais nutrientes, as calorias foram mais intensamente digeridas pelos animais jovens.

SEGUNDA PARTE

Após revisão bibliográfica, estudou-se o grau de retenção do nitrogênio, cálcio e fósforo da ração comercial referida na primeira parte deste trabalho.

A ração estudada — Dog Meal — encerrando 4,57% de nitrogênio revelou-se plenamente satisfatória para as necessidades nitrogenadas quer dos animais adultos, quer dos jovens. Entretanto, ficou demonstrado, estatisticamente, que os jovens têm capacidade mais acentuada de aproveitar o nitrogênio da dieta.

Todavia, no que diz respeito ao balanço dos elementos cálcio e fósforo, apurou-se que os ratos adultos ao ingerirem, em média, 46 mg de cálcio e 51 mg de fósforo por 100 g de peso vivo e por dia, apresentaram balanços negativos.

Por seu turno, os ratos jovens que retiraram da ração, em média, 79 mg de cálcio e 87 mg de fósforo por 100 g de peso vivo e por dia, demonstraram nítido balanço positivo desses elementos.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present work is divided in two parts as follows:

1ST. PART

Before making comparative studies upon the applicability of both chromic oxide and conventional methods in determining the digestibility coefficients of the nutrients contained in commercial ration — Dog meal — in albino rats, a brief literature review was made concerning the indexes substances which are being largely used in this field.

The chromic oxide added in the ration at 1.08% level on the dry matter basis presented an output of 92% and a variation coefficient of 3.85%. The "Student" test *t* applied to both methods — chromic oxide and conventional — pointed out that the differences found to all the nutrients were significant. The variation coefficients observed for the conventional method were very low, i.e., the minimum one was 0.85% and the highest limit was 2.09% for all the nutrients.

However, the variation concerning the ashes reached 13.68%.

In the same way, the variation presented by the chromic oxide method was also low, i.e., the highest value reached 2.59% and the minimum was 0.69%, exception made to the ashes the variability of

which was equal to 18.71%. In relation to the latter the adult rats absorbed about 33% less than the young ones.

The young rats showed, higher ability to digest the protein, fat and carbohydrates than the adults, the differences being significant.

Differences between sexes were not found significant as well as it was not observed interaction between age and methods.

2ND. PART

Studies were carried out upon the nitrogen, calcium and phosphorus retention of the commercial ration referred in the first part of this work.

The Dog meal ration, containing 4.57% of nitrogen, showed satisfactory results for the nitrogen requirements both in the adults and the young rats. However, the adults rats ingesting 46 mg of calcium and 51 mg of phosphorus for 100 g body weight, daily, presented negative retention values. On the other hand, the young rats that ingested, on average, 79 mg of calcium and 87 mg of phosphorus for 100 g body weight, daily, showed both calcium and phosphorus elements, clear positive balance.

Some considerations were given in order to account for the factors which would have determined these different results.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wants to express his appreciation to Prof. Walter Nelson for his kind authorization to carry out this work and to Prof. Clive M. McCay for making available the animals and his laboratory. Acknowledgements are also extended to all his assistants.

My sincere thanks are also due to Mr. Victor Lazar, for his cooperation in helping certain phases of this work.

BIBLIOGRAFIA

- ADOLPH, W. H. and Ch.-Ch. LIANG — 1941 — Calcium in the alimentary tract of the rat. *J. Biol. Chem.*, 137(2):517-23
- ANDREASI, F. — 1955 — Utilização do nitrogênio, cálcio e fósforo, de mistura comercial, balanceada (*Dog Meal*), no cão. *Rev. Fac. Med. Vet., S. Paulo*, 5(3):361-74

- ANDREASI, F. — 1956 — Estudo de métodos indiretos (óxido crômico e lignina) para a determinação da digestibilidade aparente no cão. *Tese. Fac. Med. Vet., U.S.P.* (Dados não publicados)
- ARMSTRONG, D. G., T. R. PRESTON and R. H. ARMSTRONG — 1954 — Digestibility of a sample of pasture grass by calves. *Nature, London*, **174**(4443):1182-3
- ARNRICH, L., C. N. HUNT, H. E. AXELROD and A. F. MORGAN — 1951 — Evaluation of six partially purified proteins by rat growth, nitrogen retention by young rats and liver regeneration. *J. Nutrition*, **43**(1):101-11
- Association of Official Agricultural Chemists — 1945 — Official and tentative methods for analysis; 6th ed. Washington, George Banta Publishing Co.
- BERGEIM, O. — 1926 — Intestinal chemistry. IV. A method for the study of food utilization or digestibility. *J. Biol. Chem.*, **70**:29-33
- CAMPBELL, H. L., O. A. BESSEY and H. C. SHERMAN — 1935 — Adults rats of low calcium content. *J. Biol. Chem.*, **110**(3):703-6
- CARROLL, R. W., G. W. HENSLEY and W. R. GRAHAM, Jr. — 1952 — The site of nitrogen absorption in rats fed raw and heat-treated soybean meals. *Science*, **115**(2976):36-9
- COUP, M. R. — 1950 — The measurement of faeces output. *Proc. Ann. Conf. New Zeal. Soc. Anim. Prod.*, **10**:3
- DANSKY, L. M. and F. W. HILL — 1952 — Application of the chromic oxide indicator method to balance studies with growing chickens. *J. Nutrition*, **47**(3):449-59
- DUYNE, F. O. V., C. S. LANFORD, E. W. TOEPFER and H. C. SHERMAN — 1941 — Life time experiments upon the problem of optimal calcium intake. *J. Nutrition*, **21**(3):221-4
- DUCKWORTH, J. and W. J. GODDEN — 1941 — The influence of dietary fiber on secretory activities of the alimentary tract. Observations on faecal phosphatase excretion and calcium and nitrogen balances of rats. *Biochemical J.*, **35**(1-2):16-23
- ESTREMER, H. R. and W. D. ARMSTRONG — 1948 — Effect of protein intake on the bones of mature rats. *J. Nutrition*, **35**(5):611-8
- FISKE, C. H. and J. SUBBAROW — 1925 — The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**:375-80
- HAAG, J. R. and L. S. PALMER — 1928 — The effect of variations in the proportions of calcium, magnesium, and phosphorus contained in the diet. *J. Biol. Chem.*, **76**(2):367-89
- HALDI, J., G. BACHMANN, W. WYNN and Ch. ENSOR — 1939 — The effects produced by an increase in the calcium and phosphorus content of the diet on the calcium and phosphorus balance and on various bodily constituents of the rat. *J. Nutrition*, **18**(4):339-409

- HAMILTON, T. S., H. H. MITCHELL, C. H. KICK and G. C. CARMAN — 1927-28 — New method tested in digestion trials. *Illinois Agric. Exp. Sta.*, 41st Ann. Rep.:119-21
- HARDISON, W. A. and J. T. REID — 1953 — Use of indicators in the measurement of the dry water intake of grazing animals. *J. Nutrition*, 51(1):35-52
- IRWIN, M. I. and E. W. CRAMPTON — 1951 — The use of chromic oxide as an index material in digestion trials with human subjects. *J. Nutrition*, 43(1):77-85
- JARL, F. — 1950 — Digestibility experiments with various feeds for dairy cattle. II. *Kungl. Lantbrukshörsök och Statens Husdjursförsök Meddelande*, Nr. 44: 1-60
- JARL, F. — 1946 — Digestibility experiments with various feeds for dairy cattle. *Lantbrukshögskolan-Husdjursförsöksanstalten Meddelande*, Nr. 20:1-100
- KANE, E. A., W. C. JACOBSON and L. A. MOORE — 1950 — A comparison of techniques used in digestibility studies with dairy cattle. *J. Nutrition*, 41(4):583-95
- KANE, E. A., W. C. JACOBSON and L. A. MOORE — 1952 — Diurnal variation in the excretion of chromium oxide and lignin. *J. Nutrition*, 47(2):263-73
- LAWRENZ, M. and H. H. MITCHELL — 1941 — The effect of dietary calcium and phosphorus on the assimilation of dietary fluorine. *J. Nutrition*, 22(1):91-101
- LLOYD, L. E. — 1952 — Coefficients of apparent digestibility as indexes of the nutritional values of rations. Thesis P.H.D. Canada, McGill University
- LLOYD, L. E. and C. M. McCAY — 1954 — The use of chromic oxide in digestibility and balance studies with dogs. *J. Nutrition*, 53(4):613-22
- LLOYD, L. E. and C. M. McCAY — 1955 — The utilization of nutrients by dogs of different ages. *J. Gerontology*, 10(2):182-7
- LOVELACE, F. E., C. H. LIU and C. M. McCAY — 1950 — Age of animals in relation to the utilization of calcium and magnesium in the presence of oxalates. *Arch. Biochem.*, 27(1):48-56
- McCAY, C. M. — 1949 — Nutrition of the dog; 2nd. ed.: 64. Ithaca, N.Y., Comstock Publishing Co. Inc.
- MEDES, G. — 1926 — Rats on diets high in phosphorus and low in calcium. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 23(8):679
- MITCHELL, H. H. — 1924(a) — A method for determining the biological value of protein. *J. Biol. Chem.*, 58(3):873-903
- MITCHELL, H. H. — 1924(b) — The biological value of proteins at different levels of intake. *J. Biol. Chem.*, 58(3):905-22
- NICOLAYSEN, R. — 1937 — Studies upon the mode of action of vitamin D. II. The influence of vitamin D on the faecal output of endogenous calcium and phosphorus in the rat. *Biochemical J.*, 31(1):107-21

- NORDFELT, S. — 1946 — Digestion experiments with young versus older pigs with special reference to the influence of fiber upon the digestibility; corn, oats, barley, peas, sugar beets for feeding, alfalfa silage and also oats and straw meal in increasing amounts in corn tested. *Lantbrukshögskolan-Hudsjursförsöksanstalten Meddelande*, Nr. 23:1-77
- OLSSON, N. — 1950 — Digestion experiments on poultry. Smältbarhetsförsök Med. Fjädrfä. *Kungl. Lantbrukshögskolan och Statens Husdjursförsök Meddelande*, Nr. 43:1-69
- ROSE, W. C. — 1937 — The nutritive significance of the amino acids and certain related compounds. *Science*, 86(2231):298-300
- ROSE, W. C. and E. E. RICE — 1939 — The significance of the amino acids in canine nutrition. *Science*, 90(2330):186-7
- ROSE, W. C., M. J. OESTERLING and M. WOMACK — 1948 — Comparative growth on diets containing ten and nineteen amino acids, with further observations upon the role of glutamic and aspartic acids. *J. Biol. Chem.*, 176(2):753-62
- SCHÜRCH, A. F., E. W. CRAMPTON, S. R. HASKELL and L. E. LLOYD — 1952 — The use of chromic oxide in digestibility studies with pigs fed "ad libitum" in the barn. *J. Animal Sci.*, 11(2):261-5
- SCHÜCH, A. F., L. E. LLOYD and E. W. CRAMPTON — 1950 — The use of chromic oxide as an index for determining the digestibility of a diet. *J. Nutrition*, 41(4):629-36
- TISDALL, F. F. and T. G. H. DRAKE — 1938 — The utilization of calcium. *J. Nutrition*, 16(6):613-20
- WALLACE, H. D., R. L. SHIRLEY and G. K. DAVIS — 1951 — Excretion of Ca⁴⁵ into the gastrointestinal tract of young and mature rats. *J. Nutrition*, 43(4):469-75