

**UNIVERSIDADE DE S. PAULO**  
**FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS**

XLVIII

# ZOOLOGIA

N.º 9



**S. PAULO — BRASIL**

**1 9 4 5**

Os Boletins da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, são editados pelos Departamentos das suas diversas secções.

Toda correspondência deverá ser dirigida para o Departamento respectivo da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras — Caixa Postal 105-B, S. Paulo, Brasil.

The "Boletins da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de S. Paulo" are edited by the different departments of the Faculty.

All correspondence should be addressed to the Department, concerned, Caixa Postal 105-B, São Paulo, Brasil.

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Reitor:

*Prof. Dr. Jorge Americano*

Diretor da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras:

*Prof. Dr. André Dreyfus*

Secretária:

*Exma. Sra. D. Ismenia Glasser Junqueira (subst.)*

---

## DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

Cadeira de Zoologia Geral:

*Prof. Dr. Ernesto Marcus* — Professor

*Dr. Michel Pedro Sawaya* — 1.º Assistente

*Dra. Marta Vanucci Mendes* — 2.ª Assistente

*Lic. Diva Diniz Corrêa* — 3.ª Assistente.

Cadeira de Fisiologia Geral e Animal:

*Prof. Dr. Paulo Sawaya* — Professor

*Dr. Erasmo Garcia Mendes* — 1.º Assistente

*Lic. Domingos Valente* — 2.º Assistente

*Lic. Maria Dolores Ungaretti* — 3.ª Assistente.

*D. Gertrudes Siegel* — auxiliar-técnica.

UNIVERSIDADE DE S. PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS

# ZOOLOGIA

N. 9



## ÍNDICE

- SAWAYA, P. — Solução perfusora para *Callinectes danae* Smith. Alguns efeitos dos seus constituintes iônicos sobre o coração... 5
- MENDES, E. G. — Contribuição para a Fisiologia dos sistemas respiratorio e circulatório de *Siphonops annulatus* (Amphibia-Gymnophiona) ..... 25
- SALOMÉ PEREIRA, R. — Estudos sobre a composição da água do mar e do sêro do sangue de *Callinectes danae* Smith ..... 69
- VALENTE, D. — Consumo do oxigênio, em diferentes tensões, pelo *Trichodactylus petropolitanus* Goeldi (Crustacea-Brachyura)... 87

SÃO PAULO ~ BRASIL

1945



# BOLETINS DE ZOOLOGIA

*Já publicados:*

## Zoologia n.º 1:

1937

MARCUS, E. — Bryozoários marinhos brasileiros I .....	5
SAWAYA, P. — Sobre o Genero <i>Siphonops</i> Wagler (1828) — Amphibia — Apoda com descrição de duas variedades .....	225

## Zoologia n.º 2:

1938

MARCUS, E. — Bryozoários marinhos brasileiros II .....	1
SAWAYA, P. — Sobre o "Ptolho da Baleia" .....	197
SAWAYA, A. — Sobre as glandulas cutaneas do <i>Siphonops annulatus</i> (Mikan) ..	269

## Zoologia n.º 3:

1939

SAWAYA, P. — Sobre a mudança da cor nos crustaceos .....	1
MARCUS, E. — Bryozoários marinhos brasileiros .....	111
SOUSA, O. M. — Estudo sobre a arquitetura da mandibula dos <i>Xenarthra</i> .....	355

## Zoologia n.º 4:

1940

MARCUS, E. Os Pantopoda Brasileiros e os demais sul-americanos .....	6
LOCCHI, R. — Pesquisas anátomo-comparativas sobre o foramen oesophagicum do diafragma em Mamíferos silvestres brasileiros .....	181
SAWAYA, P. — Sobre o veneno das glandulas cutaneas, a secreção e o coração de <i>Siphonops annulatus</i> .....	207
CARVALHO, J. P. — Notas sobre alguns <i>Calligoida</i> , com a descrição de <i>Pandarus</i> <i>marcusi</i> , sp. nov. ....	271
SAWAYA, M. P. — Sobre um <i>Blepharisma</i> novo (Ciliata) e sobre a sub-ordem <i>Odontostomata</i> , nom. nov. ....	303

## Zoologia n.º 5:

1941

MARCUS, E. — Sobre os Bryozoa do Brasil .....	3
SAWAYA, P. — Contribuição para o estudo da Fisiologia do Sistema Circulatório do Anfíbio <i>Siphonops</i> (Mikan) .....	209
SCHREIBER, G. & SCHREIBER, M. R. — Diminuição rítmica do volume nuclear do fígado e do pancreas nos girinos de anuros .....	234
CARVALHO, J. P. — Sobre <i>Dipteropeltis hirundo</i> Calman, Crustáceo (Branchiura) parasito de peixes d'agua doce .....	265
SAWAYA, M. P. — Sobre uma larva de <i>Pycnogonum pamphorun</i> Marc .....	278
MENDES, E. G. — Sobre a respiração (esofágica, traqueal e cutânea) do <i>Siphonops</i> <i>annulatus</i> (Amphibia-Gymnophiona) .....	283
GUTMARAES, M. S. C. & ROSA, C. N. — Sobre a Briozoo fauna duma Santóla, <i>Mithrax hispidus</i> (Herbst) .....	305

## Zoologia n.º 6:

1942

SAWAYA, M. P. — Sobre a classe dos <i>Siphonops</i> .....	3
MARCUS, E. — Sobre Bryozoa do Brasil II .....	57

SAWAYA, P. — Sobre o aparelho de apreensão dos alimentos e sobre a glândula do intestino médio de Ostrácodo. Ação de substâncias colinérgicas .....	153
MARCUS, E. — Sobre algumas Tubificidae do Brasil .....	107
MENDES, M. V. — Anomalia sexual num Nemátode marinho .....	255
CARVALHO, J. P. — Ocorrência de Ephydatia crateriformis (Potts) na América do Sul .....	267
MENDES, E. G. — Respostas dos Melanóforos de Traira (Hoplias malabaricus) a vários excitantes .....	285

### Zoologia n.º 7:

#### 1943

MARCUS, E. — Sobre Naididae do Brasil .....	3
SAWAYA, M. P. — Sobre a articulação em Crisiidae (Bryozoa).....	249
SAWAYA, P. — Sobre a ocorrência da Acetilcolina no tecido cardíaco de <i>Callinectes danae</i> Smith e seu efeito sobre o coração deste Crustáceo Decápodo .....	261
VALENTE, D. — O efeito de número sobre o consumo de oxigênio por Crustáceos Decápodos .....	305

### Zoologia n.º 8:

#### 1944

MARCUS, E. — Sobre Oligochaeta límnicos do Brasil .....	5
SAWAYA, M. P. — <i>Raninoides schmittii</i> sp.n. (Crustacea, Brachyura)..	137
SALOMÉ PEREIRA, R. — Sobre a composição mineral do sangue do <i>Callinectes danae</i> Smith e sobre a de um líquido para perfusão.....	147
SAWAYA, P. — Solução perfusora para <i>Callinectes danae</i> Smith (Crustacea-Decapoda) .....	151
SAWAYA, A. — Sobre a pele de <i>Siphonops annulatus</i> .....	163

# Solução perfusora para *Callinectes danae* Smith

## Alguns efeitos dos seus constituintes iônicos sobre o coração

por PAULO SAWAYA

(Laboratório de Fisiologia Geral e Animal-  
Dept. de Zoologia da Universidade de  
São Paulo).

Em continuação aos estudos realizados no último ano sobre a preparação de conveniente solução perfusora para *Callinectes danae* Smith (*Crustacea-Decapoda*) - (Sawaya 1944, p. 151; Salomé Pereira 1944, p. 147), procurou-se determinar a composição química do sôro sanguíneo (Salomé Pereira, v. este Boletim p. 69), e, em consequência, prepararam-se algumas soluções que agora foram experimentadas.

As análises de Salomé Pereira constaram de quatro séries, a saber: 1. análise dos elementos minerais do sôro sanguíneo de 56 exemplares, sendo cada sôro obtido de uma mistura de sangues de vários animais; 2. análise individual do sôro de 17 espécimes; 3. idem de 7 *Callinectes* que haviam permanecido 16 horas na água doce antes da retirada do respectivo material; 4. análise de cada sôro sanguíneo de 4 animais. Os resultados acham-se expressos na Tabela I.

-Todas as determinações foram feitas no laboratório, em São Paulo-. A sangria dos *Callinectes* processou-se ora em São Paulo, ora em Santos. No primeiro caso os crustáceos foram transportados para o laboratório envolvidos em papel úmido logo depois de pescados na baía de Santos, entre o ancoradouro do "ferry-boat" do Guarujá e o canal 6. No segundo, extraiu-se o sangue dos animais no laboratório da Secção da Fauna Marítima no Instituto de Pesca de Santos, a poucos metros do local de captura. Para a sangria intraduzia-se uma pipeta na coxa do chelípedo de modo a alcançar a respectiva artéria. O sangue assim aspirado passava para um tubo da centrífuga, fazendo-se a centrifugação depois de formado o coágulo. Outros pormenores da técnica acham-se descritos no referido trabalho de Salomé Pereira. Antes da operação, anotaram-se o peso e o sexo de cada exemplar utilizado. Não poucos animais eram portadores de ovos. Nenhum deles se achava no período de muda.

Determinado o teor dos elementos minerais de cada uma das séries de sôros, compuseram-se as soluções na base da média dos valores obtidos.

### MÉTODOS E EXPERIÊNCIAS.

Uma vez conhecida a composição química do sôro sanguíneo dos *Callinectes* prepararam-se 27 soluções perfusoras que constam da Tabela III. As soluções 1 e 2 foram feitas logo no início da primeira série de determinações, baseando-se em resultados preliminares. A diferença entre ambas está apenas na substituição total do cloreto de magnésio da n. 1 pelo sulfato de magnésio na solução 2. A n. 3 foi feita levando-se em conta todas as determinações de indivíduo por indivíduo (28 *Callinectes*) em todas as séries, excetuada a primeira; excluíram-se assim os sôros resultantes da mistura dos sangues (série 1.); a de n.º 4 corresponde aos dados conseguidos com as análises de todos os sôros provenientes de sangues individuais ou misturados, perfazendo 39 lotes de sôros extraídos de 84 *Callinectes*; a de n. 5 é constituída de acôrdo com os resultados de todas as análises individuais, excetuadas as de 7 *Callinectes* que permaneceram, durante 16 horas na água doce.

Cumprê notar que as soluções I, II, III mencionadas por Salomé Pereira (v. este Boletim p. 84) receberam na Tabela III, respectivamente, os números 4, 3 e 5.

Antes de estabelecer a composição das soluções 6 a 10 perfundiram-se previamente os corações com os líquidos acima referidos (1 a 5) tendo-se, em consequência, verificado ser a solução 4 a mais conveniente, i. é, aquela que melhor substituiu o próprio sangue do animal na perfusão. Isto posto, na tentativa de estudar-se o efeito dos aniônios  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{--}$  sobre o coração de *C. danae*, tomou-se por base a composição da solução 4, de modo a manter constante a quantidade de magnésio e substituindo-se progressivamente o cloro ligado ao magnésio por equivalentes de  $\text{SO}_4$  sob forma de sulfato de magnésio; foram assim compostas, respectivamente, as soluções 6 a 10.

Ainda partindo da solução 4 resolvi separar cada um dos seus componentes e fazer perfusões separadamente e depois em combinação duas a duas a que se adicionavam mais um ou outro componente, fazendo-se, deste modo, soluções binárias, terciárias ou quaternárias. As soluções simples receberam os ns. 11 a 14 e as binárias e terciárias o ns. 15 a 17.

Durante as repetidas experiências efetuadas em Santos houve oportunidade do uso de soluções concentradas, das quais se faziam as necessárias diluições para obtenção de soluções desejadas. Foram tentadas perfusões com estas soluções concentradas isoladas ou combinadamente, e assim mais alguns dados sobre a influência de determinados iônios sobre o coração do *C. danae* foram conseguidos. Estas soluções concentradas simples receberam os ns. 18 a 22 e as misturas binárias, terciárias ou quaternárias os ns. 23 a 27 (Tabela III).

As experiências realizaram-se, como foi dito, em São Paulo e em Santos e, nesta última cidade, além do local já indicado, também no novo Aquário Municipal. Os métodos utilizados nas perfusões foram os mesmos já descritos em trabalho anterior (Sawaya 1944, p. 153). Graças à gentileza da administração do referido Aquário, ultimamente houve possibilidade de efetuar novas séries de experiências empregando-se excelente material em condições favoráveis, pois os crustáceos foram operados logo depois de capturados. Nesta fase, do estudo adotou-se a técnica preconizada por Cole & Kazalski (1939, p. 41) que, em resumo, consiste no seguinte: remoção da parte central da carapaça em larga extensão; retirada da maior parte do trato digestivo, das glândulas a êle anexas e das glândulas genitais; durante todo o tempo da operação que, em geral, é bem suportada, o animal é mantido com o rostro para baixo afim de impedir o contáto dos sucos digestivos com o coração; secção das conexões nervosas provenientes da cadeia nervosa ventral; exposição do coração através do pericárdio seccionado. Assim era preparado o *Callinectes* fixo a uma

prancha, na mesma posição, i.é, com o rostro voltado inferiormente. Com o auxílio de um pequeno gancho ligado a um fio de cabelo conjugou-se o coração com uma alavanca muito leve. Na última fase destes estudos, no Aquário Municipal de Santos, tive oportunidade de notar que muitos exemplares não resistiam ao traumatismo da retirada dos órgãos vizinhos do coração entrando êste em colapso. À vista disto, muitos gráficos foram registrados com o coração e os demais órgãos in situ, estando o animal colocado na posição acima indicada para evitar a influência dos sucos digestivos sôbre as fibras cardíacas. Devo acentuar que em todos êstes casos a exposição do coração era feita com o máximo cuidado, afim de impedir qualquer lesão dos mencionados órgãos.

Antes de iniciar-se qualquer série das experiências foi preliminarmente determinado o pH do sangue de *C. danae* por meio do micro-eletrômetro de Coleman. O pH não variou além de 7,3 a 7,5. A seguir, as soluções foram ajustadas a êsse pH com o auxílio do bicarbonato de sódio.

As experiências em São Paulo e em Santos efetuaram-se, em geral, a 19° — 21° C. Algumas vezes, em Santos, a temperatura elevou-se até 24°. Neste caso as soluções eram resfriadas de modo a baixarem à cerca de 20°C. Esta precaução foi necessária por se ter verificado que o coração de *C. danae* não suporta bem as temperaturas altas, cessando os batimentos alguns minutos depois de o órgão ser exposto ao ar. Acontece com *C. danae* o mesmo que com o *Palinurus (Jasus) lalandii*: o coração é profundamente perturbado pelas temperaturas altas, conforme verificação de Zoond & Slome (1928, p. 89). (\*)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os gráficos obtidos com as perfusões indicam que o coração de *Callinectes*, de um modo geral, reage favoravelmente às soluções menos concentradas, mantendo o ritmo normal. Como normal considera-se o ritmo que o coração apresenta quando banhado nos flúidos do proprio corpo do crustáceo, antes de se começar a perfusão (Hogben 1925, p. 272).

Seja gotejando a solução, seja injetando-a, de modo a ficar o coração sempre imerso em boa quantidade de líquido perfusor, no início da perfusão notam-se irregularidades no funcionamento. Com soluções mais fracas estas perturbações são muito menos duradouras que com as soluções concentradas. Depois de certo tempo, porém, as modificações referidas são praticamente anuladas para, por vêzes, se acentuarem mais tarde. À vista disto, no decorrer desta exposição, as perturbações assinaladas referem-se principalmente àquelas em que órgão realmente as mostrou durante um certo tempo, evidenciando a atuação do líquido perfusor respectivo sôbre as fibras cardíacas. À êste propósito, convem lembrar que, inicialmente, o animal costuma apresentar modificações dos seus abatimentos cardíacos, mesmo sem influência de qualquer líquido perfusor. Na maioria dos casos, porém, estes

---

(\*) Aproveito a oportunidade para agradecer ao Dr. Aylton Gonçalves e Sr. João de Paiva Carvalho, da Secção da Fauna Marítima do Instituto de Pesca, assim como ao sr. Joaquim Ribeiro de Moraes, administrador do Aquário Municipal de Santos, pela benévola acolhida dispensada ao pessoal do Laboratório de Fisiologia Geral e Animal nos seus laboratórios. Ao Dr. Rubens Salomé Pereira pelo auxílio prestado no preparo das soluções e na revisão dos cálculos; aos lic. Domingos Valente e Edmundo Ferraz Nonato e ao auxiliar João Eufrosino pela dedicada participação neste trabalho, apresento aqui os meus agradecimentos.

fenômenos são muito passageiros, normalizando-se o órgão dentro de alguns minutos. Assim sendo, em várias séries de experiências procurei perfundir as soluções durante tempo tão longo quanto o órgão o permitisse. Os fenômenos acima assinalados encontram paralelo com os descritos por Cole & Kazalski (1. c., p. 41) em *Homarus americanus*. Também neste crustáceo, durante os primeiros minutos da perfusão, a frequência, a intensidade e a amplitude dos batimentos cardíacos variam consideravelmente.

O gráfico n. 1 mostra que a solução 1 provoca diminuição gradativa da frequência até a parada em diástole. O tempo de duração desta experiência variou em média entre 50 e 60 minutos.

### T A B E L A 1

Composição dos sôros sanguíneos de *Callinectes danae* Smith segundo as determinações de Salomé Pereira (1945). Sais expressos em gramas por 1000. M : molaridade.

Série-exp.	NaCl		KCl		CaCl <sub>2</sub>		MgCl <sub>2</sub>	
		M		M		M		M
1	20.080	.344	.677	.009	1.126	.010	1.275	.013
2	25.195	.431	.880	.012	1.691	.015	1.555	.016
3	27.010	.462	.985	.013	.900	.008	2.317	.024
4	28.784	.492	1.119	.015	1.996	.018	2.006	.021

As soluções 3, 4 e 5, compostas rigorosamente de acôrdo com os sôros analisados, mostraram-se mais favoráveis. Das três, a 4 é a menos concentrada em todos os componentes, com exceção do cloreto de magnésio. A diferença entre a 3 e a 5 está em possuir esta menor quantidade de cloreto de sódio e maior de calcio. Não obstante serem relativamente pequenas as diferenças nas respectivas composições, não maiores em geral que 10%, as reações apresentadas pelos corações foram, em via de regra, evidentes. Assim é que, perfundidos com a solução 3, a mais concentrada em todos os sais, com exceção do cloreto de calcio, deu-se diminuição da frequência e aumento ligeiro da intensidade. Pouco depois verificou-se o inverso, repetindo êstes fenômenos durante os primeiros 25 minutos, após o que, tanto a intensidade como a frequência foram decrescendo gradativamente até a paralisação em diástole depois de uma hora do início da perfusão. O gráfico n. 2 indica o princípio e o fim desta.

Com a solução 5, de concentração inferior à 3, exceto quanto ao cloreto de calcio, as perturbações foram menos acentuadas, mas ainda assim bastante sensíveis. Logo depois de iniciada a perfusão houve marcado aumento da frequência e maior amplitude. Êstes fenômenos duraram 30 minutos. A seguir o coração foi diminuindo pouco a pouco a intensidade e o ritmo até a parada em diástole (gráfico n. 3).

Com a solução 4, a menos concentrada de tôdas, houve modificações insignificantes no ritmo dos batimentos cardíacos. Logo que a influência do liquido perfusor se fez sentir, deu-se ligeira acentuação da intensidade, fenômeno ocorrido 10 minutos depois da perfusão. A seguir o ritmo passou ao normal, tendo durado a perfusão 6,5 horas. As pequenas variações observadas não revelam disfunção do órgão. O gráfico n. 4 mostra uma fase da experiência com esta solução. Ao fim do referido tempo, o coração ainda pulsava, mas não foi possível, infelizmente, obter o registro gráfico.

## T A B E L A II

Composição da água do mar do local de captura dos *Callinectes* e correspondente a cada uma das séries de determinações (Tabela I). Sais expressos em gramas por 1000. M : molaridade.

Série-exp.	NaCl		KCl		CaCl <sub>2</sub>		MgCl <sub>2</sub>	
		M		M		M		M
1	10.10	.173	.308	.004	.307	.003	.789	.008
2	27.03	.462	.843	.011	.742	.007	5.198	.055
3	19.49	.333	.674	.009	1.106	.010	3.850	.040
4	21.69	.371	1.144	.015	1.385	.012	4.308	.046
Média	18.05	.333	.742	.009	.885	.008	3.551	.037

Verificadas assim as reações de *C. danae* às aludidas soluções perfusoras, notando-se mais satisfatória a n. 4, passei a investigar a influência dos anionios Cl<sup>-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>--</sup> sobre o órgão. Como é sabido, tanto na água do mar onde vivem êstes crustáceos, como no seu próprio sangue, alguns catiônios estão unidos ao SO<sub>4</sub><sup>--</sup>. Até o momento não foi possível fazer a determinação dêsse aniônio no sôro sanguíneo de *C. danae*. Todavia, a título de experiência preliminar, tentou-se a substituição parcial ou total do cloreto pelo sulfato de magnésio. Na substituição total (solução 2) as reações de *C. danae* caracterizam-se por uma aceleração inicial pronunciada, seguindo-se diminuição gradativa da frequência, que se acentúa até a paralização completa em diástole, em cerca de 30 minutos (gráfico n. 5).

Verificada assim a reação de *C. danae* à perfusão com o sulfato de magnésio na ausência do cloreto, procurei estudar as reações do órgão às substituições parciais do segundo pelo primeiro sal. Os resultados foram os seguintes: a) quando se usa o sulfato de magnésio juntamente com o cloreto na proporção aproximadamente de 10:90 (solução 6), o coração reage acelerando as pulsações, mas diminuindo a intensidade (gráfico n. 6); a parada dá-se em diástole cerca de 70 minutos depois; b) nas soluções em que o sulfato de magnésio substitui o cloreto nas proporções 20:80, 30:70 e 40:60 (soluções 7, 8 e 9) os fenômenos repetem-se como em a), variando

apenas a intensidade; não é possível estabelecer aqui a gradação dessa variação, pois que ora a intensidade e a frequência se acentuam, ora se dá o contrário; c) finalmente, com a solução 10, em que partes de cloreto foram substituídas por outras tantas de sulfato de magnésio (50:50), pronunciadas são as alterações do funcionamento do coração. Nos primeiros minutos não há modificações notáveis, mas depois de 10 minutos, a intensidade vai decrescendo rapidamente, embora se mantenha a mesma frequência; 30 minutos após, tanto a intensidade como a frequência diminuem até a parada em diástole, que se dá em geral hora e meia após o início da perfusão. Os gráficos obtidos durante estas experiências não permitiram reprodução tipográfica.

A seguir, os diversos componentes da solução 4 foram perfundidos isoladamente. O gráfico n. 7 mostra que o coração de *C. danae* reage ao cloreto de sódio (solução 11) acelerando as pulsações no início e depois retardando-as até a parada em diástole. O coração não resiste mais que 40 minutos a esta perfusão. Com o cloreto de potássio (gráfico n. 8), a reação é mais intensa: o coração diminui rapidamente a amplitude e a frequência e para em sístole. O cloreto de cálcio, na concentração referida, (solução 13) provoca aceleração dos batimentos e parada em diástole (gráfico n. 9). A perfusão com o cloreto de magnésio (solução 14) não apresenta, inicialmente, alterações dignas de nota, mas, pouco depois (10 minutos), há pronunciado retardamento das pulsações até parada em diástole (gráficos n. 10 e 11). Tal comportamento do músculo cardíaco do *C. danae* confirma a opinião de Wells (1928, p. 274) e outros, que indicam serem as propriedades fisiológicas do coração dos Decápodos mais semelhantes às dos músculos voluntários que às das fibras cardíacas dos Vertebrados.

As misturas binárias destas soluções simples revelaram que o coração de *C. danae* perfundido com a mistura  $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$  pH 7,5 (solução 15) mantém o ritmo cardíaco normal durante duas horas. Comparados com os gráficos da perfusão com a solução 4, não mostram diferenças acentuadas. A inclusão do cloreto de potássio (solução 16) ou do cloreto de magnésio (solução 17) na solução não traz modificações no funcionamento do coração, e, se estes sais são de novo eliminados, também não se notam modificações no ritmo do coração. Isto quer dizer, portanto, que, pelo menos nas concentrações aqui usadas, tanto o cloreto de potássio como o de magnésio podem ser eliminados da solução 4, e o coração mantém o seu ritmo normal durante duas horas. Além desse período de tempo, porém, será necessário ajuntá-los à solução perfusora.

Com soluções 10 vezes mais concentradas, das quais se faziam as necessárias diluições, tive oportunidade de perfundir corações deste crustáceo, usando-as simples ou combinadas (binárias, terciárias ou quaternárias). A Tabela III mostra as concentrações destas soluções de n. 18 a 27. Com as simples (soluções 18 a 22) os

TABELA III

Soluções perfusoras para *Callinectes danae* compostas segundo o teor dos sais minerais do sêro sanguíneo. Sais expressos em gramas por 100. M : molaridade.

Sol. n.	NaCl M		KCl M		CaCl <sub>2</sub> M		MgCl M		MgSO <sub>4</sub> M	
1	2.508	.429	.090	.012	.189	.017	.158	.017	—	—
2	2.508	.429	.090	.012	.189	.017	—	—	.187	.016
3	2.620	.448	.094	.013	.154	.014	.181	.019	—	—
4	2.444	.418	.086	.012	.142	.013	.166	.017	—	—
5	2.590	.443	.092	.012	.174	.016	.164	.017	—	—
6	2.444	.418	.086	.012	.142	.013	.149	.016	.020	.001
7	2.444	.418	.086	.012	.142	.013	.133	.014	.042	.003
8	2.444	.418	.086	.012	.142	.013	.116	.012	.062	.005
9	2.444	.418	.086	.012	.142	.013	.110	.012	.083	.007
10	2.444	.418	.086	.012	.142	.013	.083	.009	.105	.009
11	2.444	.418	—	—	—	—	—	—	—	—
12	—	—	.086	.012	—	—	—	—	—	—
13	—	—	—	—	.142	.013	—	—	—	—
14	—	—	—	—	—	—	.166	.017	—	—
15	2.444	.418	—	—	.142	.013	—	—	—	—
16	2.444	.418	.086	.012	.142	.013	—	—	—	—
17	2.444	.418	—	—	.142	.013	.166	.017	—	—
18	26.162	4.476	—	—	—	—	—	—	—	—
19	—	—	.940	.126	—	—	—	—	—	—
20	—	—	—	—	1.748	.157	—	—	—	—
21	—	—	—	—	—	—	.810	.190	—	—
22	—	—	—	—	—	—	—	—	2.288	.190
23	26.162	4.476	—	—	1.748	.157	—	—	—	—
24	26.162	4.476	.940	.126	1.748	.157	—	—	—	—
25	26.162	4.476	.940	.126	—	—	.810	.190	—	—
26	26.162	4.476	.940	.126	1.748	.157	—	—	2.288	.190
27	26.162	4.476	.940	.126	1.748	.157	.810	.190	—	—

O pH de cada uma das soluções foi ajustado ao pH do sangue do *Callinectes*, i.é, entre 7,3 e 7,5. Nas soluções 1 a 14 foi incluída sempre a glicose na proporção de 1 gr. por 1000 de veículo.

mesmos fenômenos já assinalados com as perfusões anteriores (soluções 11 a 14) se repetiram, com a diferença apenas de o coração resistir muito menos tempo à perfusão. Exceção feita do cloreto de potássio que paralisou imediatamente o coração em sístole, com os outros sais o tempo reduziu-se, em média, à metade. Ainda aqui a associação cloreto de sódio e de calcio (solução 23) deu os mesmos resultados como na perfusão com a solução 15, mas o coração, trinta minutos depois parou em diástole, voltando, porém, ao ritmo primitivo quando o potássio foi adicionado à mistura. Esta solução terciária (solução 24) ocasionou principalmente o aumento da frequência dos batimentos. A substituição do calcio nesta solução pelo magnésio (solução 25) determina parada em sístole, o que indica predominância do efeito do potássio. A substituição do cloreto de magnésio pelo sulfato (solução 26) conduz às mesmas modificações. Finalmente, quando todos os componentes inorgânicos estão presentes na solução concentrada (n. 27) há aumento da frequência e da amplitude, mas o coração não para antes de 2 horas.

O coração dêste Decápodo mostra grande variação individual às perfusões acima referidas. Quero crer que seria necessário fazer perfusões com soluções mais concentradas que as de n. 18 a 27 para se obterem reações mais evidentes. A finalidade principal deste trabalho sendo a determinação de uma solução satisfatória para perfusão cardíaca de *C. danae*, os efeitos de seus componentes iônicos sobre o coração foram aqui tentados como estudo complementar. As condições no laboratório do novo Aquário Municipal de Santos não permitiram outras experiências indispensáveis para se estabelecer o antagonismo entre os diferentes catiônios. No entretanto, ficou bem estabelecido, a meu vêr, que o coração de *C. danae* reage favoravelmente à solução 4, cujos componentes correspondem aos componentes inorgânicos do sôro dêste crustáceo.

Durante as experiências cada animal foi perfundido apenas com uma solução, de um modo geral, tendo sido experimentados vários animais para uma mesma perfusão. Esse cuidado tem sua causa no fato de se obterem muitos resultados contraditórios, quase sempre incontroláveis, quando se emprega um mesmo animal para várias soluções, principalmente no caso de se usarem, em primeiro lugar, soluções menos concentradas. Tal efeito está de acôrdo com as observações de Cole & Kazalski (1. c., p. 42) que observaram o mesmo fenômeno em *Homarus americanus*.

Êstes autores tiveram oportunidade (1. c., p. 46) de comparar os resultados obtidos com êste crustáceo e os de Cole, Helfer & Wiersma (1939, p. 298) conseguidos com *Cambarus clarkii*, chegando à conclusão de que *Homarus* é menos sensível às alterações do conteúdo iônico da solução perfusora que *Cambarus*. Em relação a *C. danae*, os meus resultados indicam haver aqui uma sensibilidade não tão grande quanto a de *C. clarkii*, mas um tanto maior que a de *H. americanus*. Isto está, sem dúvida relacionado com a nítida diferença de composição das soluções que melhores resultados deram na perfusão cardíaca dêstes crustáceos (Tabela IV).

Comparando os dados desta tabela nota-se que os valores da solução 4 (de Salomé Pereira) se encontram entre os das soluções propostas por Hogben (1925), Cole & Kazalski (1939), Cole & Parker (1940) de um lado e os da solução preparada por Cole, Helfer & Wiersma (1939) de outro. Desta comparação poder-se-á deduzir que o *C. danae* permanece, quanto à sensibilidade às soluções perfusoras, entre o *H. americanus* e o *C. clarkii*.

Posteriormente Cole (1941, p. 3) fez estudo comparativo da influência de várias soluções perfusoras sobre o coração de *H. americanus* chegando a confirmar como mais adequada a solução já preconizada por Cole & Kazalski (Tabela IV). Este fato está de acordo com o princípio geralmente adotado de ser necessário, para a perfusão do coração in situ durante longo tempo, corresponder a solução perfusora à composição inorgânica do soro. É o que se verifica realmente com *C. danae*. Das soluções aqui empregadas a de n. 4 é a que mais se aproxima da composição do soro sanguíneo do *Callinectes*, tomada em seus valores médios. Sem dúvida, quando se conhecer a quantidade do aniônio  $SO_4$  no soro sanguíneo desse Crustáceo, essa solução perfusora deverá ser completada ajuntando-se esse aniônio. No momento já se pode dizer que a quantidade de  $SO_4$  não poderá exceder de 50 por 100 da quantidade de cloreto de magnésio, pois, como foi visto, as substituições até cerca de 40 por 100 não causam alterações apreciáveis no funcionamento do órgão. Por outro lado, o fato de a solução 4 ser realmente satisfatória para o funcionamento do coração de *C. danae*, é mostra evidente de que para tanto é possível prescindir-se dos referidos iônios  $SO_4$ .

As diferenças de sensibilidade aos iônios entre *C. danae* e *H. americanus* e *Cambarus clarkii* também podem ser levadas à conta de fatores ecológicos. Quanto ao *Cambarus*, é natural seja mais afetado pelas variações do conteúdo iônico do líquido perfusor, visto ser animal tipicamente da água doce, fato aliás já acentuado no trabalho de Cole de 1941 (p. 6). *Homarus* e *Callinectes* são Decápodos marinhos, mas este último deve ser considerado mais como habitante das águas salôbras (Brues 1927, p. 5; Sawaya 1944, p. 151) enquanto o primeiro é animal do mar aberto, o que quer dizer que o *Callinectes* é de maior euryhalinidade. Os *Callinectes* da baía de Santos não vão além da barra, i.é., não costumam atingir o mar alto, pois preferem as regiões dos inúmeros canais da baía em que a água é tipicamente de baixa salinidade. Como acontece com *Callinectes sapidus* (Lochhead & Newcombe 1942, p. 81; Sandoz & Rogers 1944, p. 218) *C. danae* desova em águas de baixa salinidade (dados não publicados do autor). Mas a fisiologia da euryhalinidade como acentua Prenant (1933, p. 113) não é tão simples como poderá parecer à primeira vista. Pelo contrário, é bem complexa e, por isso, penso este ponto merece reparo especial.

Cole e colaboradores verificaram não ser conveniente, pelo menos para *Homarus*, o emprêgo da água do mar como solução perfusora, em virtude da grande diferença de teor iônico dos seus elementos quando comparados com o do soro desse crustáceo. Não

obstante, quando se perfunde o coração de *Homarus* com água do mar (Cole 1941, p. 3), os batimentos são normais durante 10 minutos. Se bem que não sejam comparáveis *Homarus* e *Callinectes*, com êste último, sem dúvida por causa de sua acentuada euryhalinidade, a perfusão cardíaca com água do mar, em certos casos, tem efeitos duradouros. Tive oportunidade de verificar êste fato em Caiobá, no Estado do Paraná, quando perfundi o coração de *C. danae* com êsse líquido ou com a solução recomendada por Pantin (Sawaya 1943, p. 266), cuja composição é muito próxima da água do mar. Tal comportamento de *C. danae* encontra agora confirmação nas atuais experiências. Pequenas diferenças de composição da solução perfurosa determinam perturbações de funcionamento cardíaco, as quais porém, são passageiras, porquanto, depois de certo tempo, o órgão volta à normalidade. E, como se verá, o teor salino de água da baía de Caiobá é muito próximo da salinidade do sôro sanguíneo de *C. danae*.

As perfusões com água do mar do mesmo local onde foram capturados os *C. danae*, i.é, do canal de Santos, demonstram perturbações no funcionamento do coração. Além disso, as pulsações não duram mais que 60 minutos. Êste fato está de acôrdo com os resultados das experiências realizadas com o emprego de soluções mais fracas. Não está, porém, em contradição com o que foi observado em Caiobá, visto como, nas experiências efetuadas nessa práia do Paraná a água do mar empregada tem uma salinidade diferente da do canal de Santos. As tentativas de determinação da salinidade então realizadas revelaram cêrca de 26 por 1000 o que está muito mais próximo da composição do sôro sanguíneo do crustáceo que a do canal de Santos, conforme se vê pelas tabelas I e II. Comparando a composição da água do mar do canal santista (valores médios da tabela II) com os dados da solução 4, que representam a média dos valores do componentes iônicos do sôro sanguíneo do Decápodo de que me ocupo, vêr-se-á que o *C. danae* concentra a maioria dos sais, pois o seu sôro possui 135 por cento mais sódio, 116 por cento mais potássio, 160 por cento mais cálcio e 52 por cento menos magnésio que a água do canal de Santos. E' muito possível que as perturbações do funcionamento do coração do *C. danae* ocorridas durante as perfusões com a água do canal de Santos sejam devidas a insuficiências de determinados sais, cuja concentração é bem maior no sôro sanguíneo do crustáceo. Com o *H. americanus* verifica-se o contrário segundo os dados publicados por Cole & Kazalski (1. c., p. 42), pois que a água do mar contem mais 540 por cento de sulfato, 477 por cento mais magnésio, 39 por cento menos calcio e 9 por cento menos potássio que o sôro da lagosta. E' interessante notar ainda que, em *H. vulgaris*, a lagosta européia, Robertson (1939, p. 390) encontrou outros valores para o conteúdo iônico do sangue dialisado. O mesmo aconteceu com *Cancer pagurus*. Ambos os crustáceos, diz Robertson, mantêm equilíbrio dinâmico com a água do mar, contendo os seus sôros mais sódio, potássio e cálcio e menos cloro, magnésio e sulfatos que a água do

mar (1. c., p. 397). Estes resultados de Robertson são mais próximos dos encontrados em *C. danae* que em *H. americanus*.

TABELA IV

Diferentes soluções perfusoras utilizadas para Crustáceos. Soluções molares.

AUTORES	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub>	NaHCO <sub>3</sub>
Hogben (1925) .....	.500	.025	.040	—	—	—
Cole, Helfer & Wiersma (1939) .....	.205	.0054	.0135	.0026	—	.0022
Cole & Kazalski (1939) ....	.452	.0150	.0250	.004	.004	—
Cole & Parker (1940) .....	.456	.015	.0250	.006	.006	—
Salomé Pereira (1945) .....	.418	.012	.0130	.017	—	*

\* q.s. para ajustar o pH da solução a 7,5.

Os dados acima referidos ainda concordam com a distribuição de *C. danae* no litoral Sul. Vivendo nas regiões costeiras povoadas de inúmeros rios, encontra oportunidade de migrar para regiões de salinidade muito baixa, onde já foi capturado como por exemplo no rio Itanhaem (Sawaya 1944, p. 151) ou para outras de salinidade mais alta, tais como a praia de Caiobá. Assim, o animal mostra-se sensível a variações da concentração iônica mas muito cedo se adapta às mesmas. Com *Homarus* isso não acontece. É um crustáceo do fundo do mar como *Callinectes*, mas circunscrito a determinadas regiões. Não pude obter na bibliografia ao meu dispôr dados sobre a distribuição de *H. americanus*, mas o crustáceo correspondente dos mares europeus, o *H. vulgaris*, não penetra em regiões de salinidade em média inferior a 15 por 1000. Balss (1926, p. 24) indica o limite de penetração o Kategatt e Schellenberg (1928, p. 56) assinala-o no Grande Belt. Em tais regiões, segundo Schultz (1932, p. 55) a salinidade desce a 20 por 1000 em Fevereiro e em Agosto a 15 por 1000. Acontece, porém, que *H. vulgaris* não conta nesses lugares com a possibilidade de penetrar na água doce, e daí, sem dúvida, sua menor euryhalinidade em relação a *C. danae*.

Não obstante sua acentuada euryhalinidade o *C. danae* mostrou-se menos resistente às soluções perfundidas combinadamente como as feitas em *Homarus*. Embora não tenha observado em nenhum caso a paralisação imediata do coração, as modificações do ritmo e da amplitude foram bastante pronunciadas. A não paralisação do órgão indica que nas concentrações aqui usadas (Tabela III) se dá o equilíbrio entre o potássio e o calcio permitindo os batimentos, e que o *C. danae* é capaz de adaptar-se, dentro do limite estabelecido pelas referidas soluções, rapidamente às condições da perfusão.

## R E S U M O.

1. O coração do *Callinectes danae*, quando perfundido com uma solução cujos componentes inorgânicos correspondem qualitativa e quantitativamente aos componentes do sôro sanguíneo (NaCl .418 M, KCl .012 M, CaCl<sub>2</sub> .013 M, MgCl<sub>2</sub> .017 M), mantém o ritmo normal das pulsações pelo menos durante 6,5 horas.
2. A água do mar do local de captura destes crustáceos (canal de Santos) é menos concentrada em todos os seus componentes iônicos que o sôro sanguíneo do *C. danae*, exceção feita do cloreto de magnésio.
3. Os principais iônios inorgânicos do sôro necessários para a solução perfusora são — Na, K, Ca, Mg.
4. A ausência de K, de Mg e de SO<sub>4</sub> é tolerada durante cerca de 2 horas.
5. O pH do sôro de *C. danae* varia entre 7,3 e 7,5.
6. Quando imerso na mixtura NaCl + CaCl<sub>2</sub> (.418 M & .013 M) pH 7,5, os batimentos do coração de *C. danae* prolongam-se até cerca de 2 horas.
7. As perfusões com soluções 10 vezes mais concentradas que a solução correspondente à composição inorgânica do sôro sanguíneo de *C. danae* (solução 4) produzem irregularidades dos batimentos cardíacos. O coração não para quando estas soluções são binárias, terciárias ou quaternárias. As alterações mais importantes referem-se ao aumento da frequência. Exclusão do cloreto de potássio das misturas terciárias ou quaternárias provoca retardamento do ritmo cardíaco. A falta do cloreto de calcio produz parada sistólica.

★

★                      ★

A PERFUSING SOLUTION FOR THE HEART OF *Callinectes danae*  
SMITH. SOME EFFECTS OF ITS CONSTITUENT IONS  
ON THE HEART

Some experiments have been made to obtain a satisfactory solution for the *Callinectes danae*-heart, one of the most common crab of the Brazilian seashore. Analyses of the crustacean serum have been done by Dr. Rubens Salomé Pereira at the Laboratory of General and Animal Physiology of the Department of Zoology (see this Bulletin, p. 69) on samples of fresh sera. The results of these analyses are summarised in table I. Components of the sea water from the same place where the *C. danae* were caught are indicated in table II.

Based on these results 27 perfusing solutions were composed (Table IV). Before each experiment the pH of the blood of the Decapod was measured with the glass electrode microelectrometer of Coleman, and each solution adjusted to this pH which did not vary more than 7,3 to 7,5.

The heart was prepared for perfusion as indicated by Sawaya (1944, p. 153). During several experiments, chiefly those performed in the laboratory of the new Aquario Municipal of Santos, the method pointed out by Cole & Kazalski (1939, p. 41) was adopted. Sometimes, however, the *C. danae* did not support the removal of the internal organs, and in some cases, these organs have not been removed. Care was taken about the temperature. As Zond & Slome (1928, p. 89) asserted for *Palinurus*, the *C. danae* is also sensitive to high temperature. In many cases the perfusing solutions had to be cooled in order to be brought down to 19° — 21°C. Only fresh hearts were used, because with *C. danae* too, as Cole & Kazalski (l. c., p. 42) showed with *Homarus americanus*, old hearts are more sensitive to changes in ionic content.

Perfusing solutions 1 and 2 were made according to the preliminary analyses of serum. In solution 2 magnesium chloride has been substituted for magnesium sulfate. Solution 3 corresponds to the inorganic components of the serum from 28 *C. danae* and solution 4 contains the same salts concentration (sodium, potassium, calcium and magnesium chloride) determined in 39 set of sera from 84 *C. danae*. To prepare solution 5 analyses from all sera obtained were computed, excepted 7 samples from the crustaceans which remained 16 hours in freshwater.

Comparing these solutions 1 to 5 (Table III), it is evident that n. 4 has the lowest concentration, and it corresponds closely the inorganic composition of the *C. danae* serum (middle values of table I).

Before preparing other solutions some preliminary perfusions were tried. The reactions of the *C. danae* to the above solutions (1 to 5) showed that solution 4 is the most satisfactory. The heart of *C. danae* has been perfused during 6,5 hours with this solution and the normal rhythm was unaltered. As normal rhythm I mean a rhythm which in regard to amplitude and frequency does not sensibly differ from that of the heart, while bathed with its own tissue fluids, before perfusion begins (Hogben 1925, p. 272). Solutions 3 and 5 are more concentrated than n. 4. The heart of *C. danae* reacts to these solutions modifying the rhythm, and does not beat more than 2 hours.

Solution 1 causes gradually decreased rate and amplitude, although the heart would beat for as long as 60 minutes and finish by diastolic arrest. This occur when the heart is perfused with solution 3 (figure n. 2). The modifications of the heart rhythm by solution 5 are slighter than those determined by solution 1. Immediately after the perfusion begins it causes increase of frequency and amplitude and 30 minutes after the tone decreases

and the heart arrests in diastole (figure n. 3). Solution 4 caused no significant changes in frequency, tone or amplitude at the beginning of perfusion, and 10 minutes after recovery to normal rhythm would occur. The beats of the heart are prolonged in these conditions during more than 6,5 hours, and it would be probable that the heart would continue beating for more time (figure n. 4).

SO<sub>4</sub> ions have not yet been determined whether in *C. danae* serum or in sea water of Santos bay. Perfusing solutions n. 6 to n. 10 based on solution 4 ionic components, were prepared by substituting the magnesium chloride for magnesium sulfate in such a way that the chloride ions were replaced by equivalents of sulfate ions. These attempts were made to observe the reactions of *C. danae*-hearts to these later ions. The introduction of SO<sub>4</sub> ions in solution 4 does not affect the normal beats of the heart, while these anions do not correspond to more than 30% equivalent substitution. Increase of sulfate ions causes sensible alterations of the heart rhythm. In these cases the heart stop in diastole, as it has been seen when perfusing solution 2 was used (figure n. 5). Figure n. 6 shows the influence of SO<sub>4</sub> ions added to the solution 4, corresponding to 10 per cent of substitution of magnesium chloride (solution 6).

Solutions of single components all caused arrest of the heart. All these solutions (11 to 14) are based on the composition of solution 4 (Table III). The hearts-beats were regular during the first few minutes of perfusion with sodium chloride (solution 11), but irregularities begin soon and 30 minutes after the heart stops in diastole. Systolic arrest resulted from potassium chloride perfusion in less than 1 minute (solution 12, figure n. 8). Calcium chloride (solution 13) increases the frequency, tone and amplitude and, finally, diastolic stoppage (figure n. 9). With magnesium chloride (solution 14) firstly the normal rhythm is maintained but soon after frequency and amplitude decline and the heart stops in diastole (figure n. 10 e 11). This behaviour of *C. danae*-heart confirm the opinion of Wells (1928, p. 274) and others, who appoint that the physiological properties of the Decapod-heart resemble the voluntary rather than the cardiac fibres of vertebrates.

Binary solutions were also tried. Sodium and calcium chloride (solution 15) maintain a normal rhythm during two hours after which the heart stops in diastole. When potassium (solution 16) or magnesium (solution 17) are added to this mixture there is no modification of the heart beats, but the normal rhythm is prolonged. This indicates that tertiary and quaternary salt solutions were better than binary ones, when they are prepared in certain proportions as indicated in Table III.

Single, binary, tertiary and quaternary solutions ten times more concentrated (solutions 18-27) caused sensible modifications on the heart pulsations. Omission of potassium from sodium, potassium and calcium chloride solution (n. 23) provokes diastolic stoppage, but the heart recovers the primitive rhythm when potassium is ad-

mitted again to the mixture. This tertiary solution 24 increases chiefly the frequency of the heart-beats. Removing calcium from this solution and adding magnesium (solution 25) there is systolic arrest, indicating the predominant effect of potassium. Substitution of magnesium chloride by magnesium sulfate (solution 26) leads to the same modifications. Finally when all inorganic components are present in such a concentrated solution (n. 27) the heart-beats have increase of frequency and in tone, but it does not stop before two hours.

The heart of this Decapod shows a high individual variety of reactions. I had to prepare solutions more concentrated than those n. 18-27 to obtain more evident reactions of the heart. The chief purpose of these experiments being the determination of a more satisfactory perfusing solution for the *C. danae*-heart, the effects of its constituent ions on the heart have been tried as a complementary study. The conditions in the laboratory of the new Aquario Municipal of Santos did not permit to continue the experiments in order to determine the antagonism between the different ions of the solutions. However, it was well established that the *C. danae*-heart reacts favourable to the solution 4, the component of which correspond closely to the inorganic components of the serum of this crustacean.

Compared with the American lobster the *C. danae*-heart shows smaller sensitiveness to changes in ionic content of the perfusing solution. This point is discussed in this report. Table IV indicates several perfusing solutions used for lobster, crayfish and *C. danae*. The solution here proposed as the most favourable (solution 4) meets between those proposed by Hogben (1925), Cole & Kazalski (1939) and Cole & Parker (1940) for the lobster and that offered by Cole, Helfer & Wiersma (1939) for the crayfish. More recently, Cole (1941, p. 3) in his study of several perfusing solutions for the lobster, asserted that the most satisfactory solution is that indicated before by Cole & Kazalski (1. c.). The reactions of the *C. danae*-heart to the solution 4, which is less concentrated than the others solutions for the lobster, and more than that of Cole, Helfer & Wiersma, seems to me justified by the habitat of this crab. *C. danae* lives in fresh and in brackish waters. Those living in Santos do not occur out of the bay, but prefer the regions of the channels in which water is typically of low salinity. As *C. sapidus* does (Lochhead & Newcombe 1942, p. 81; Sandoz & Rogers 1944, p. 218) *C. danae* hatch in water of very low salinity (unpublished data of the author). I did not find any notice about the distribution of the American lobster (*Homarus americanus*), but it is well known that the correspondent european lobster (*H. vulgaris*) has its limit of penetration in the North Sea in the Kattegat (Balss 1926, p. 24) and the Grossebelt (Schellenberg 1928, p. 56). In these regions Schultz (1928, p. 55) points out 20 per 1000 of salinity in February and 15 per 1000 in August. It is generally known that the *H. vulgaris* in these regions has no chance to invade brackish and

fresh waters. These ecological data agree with the lower sensitivity of *Homarus* to changes in ionic content of the perfusing solution, when compared with *C. danae* and *Cambarus clarkii*.

Sea water is not a so poor perfusing medium for *C. danae* as Cole & Kazalski (l. c., p. 42) and Cole (1941, p. 5) found for the lobster. The later author asserts that sea water contains 540 per cent more sulfate, 477 per cent more magnesium, 39 per cent less calcium and 9 per cent less potassium than the lobster serum does. The contrary has been observed with *C. danae*. Its serum concentrates the salts, so that it possesses 135 per cent more sodium, 116 per cent more potassium, 160 per cent more calcium and 52 per cent less magnesium chloride than sea water from the Santos bay.

In his recent paper Robertson (1939, p. 390) gives some data of the ionic composition of the dialysed blood of *H. vulgaris*, by which it is seen that there is a remarkable similarity with regard to sea water. The same is presented by *Cancer pagurus*. Both crustaceans maintained dynamic equilibrium with sea water, their sera containing more sodium, potassium and calcium and less chloride, magnesium and sulfate than sea water (Robertson l. c., p. 397). These results agree much more with those obtained with *C. danae* than those given by Cole (1941, p. 5) on *H. americanus*.

These different data explain the large euryhalinity of *C. danae*. This euryhalinity seems much higher than that of the lobster. Sea water from the same place catch of *C. danae* used as perfusing medium gives evidence that it is not so satisfactory as solution 4, but the heart of the crustacean beats during two hours and finally presents diastolic stoppage. This reaction of the *C. danae*-heart to sea water was once determined in earlier experiments in Caiobá (Sawaya 1943, p. 266) the salinity of which is no more than 26 per 1000. As it is seen in Table I this number is very close to the concentration of sodium chloride in *C. danae* serum. From all results it became clear that solution 4 which agrees very closely with the inorganic content of the serum of *C. danae* is the best solution for the heart.

#### S U M M A R Y

1. The heart of the crab *Callinectes danae* is allowed to prolong its normal beating (6,5 hours) when immersed in an inorganic perfusing solution the composition of which agrees closely with the inorganic composition of the crustacean serum.
2. The environmental sea water from the bay of Santos is less concentrated in all ionic contents than those of the *C. danae* serum, excepted magnesium chloride.
3. The chief necessary inorganic ions of the serum are — Na, K, Ca, Mg.
4. Absence of K, Mg and  $\text{SO}_4$  will be tolerated for about two hours.
5. The pH of the serum of *C. danae* varies between 7,3 and 7,5.

6. The heart of *C. danae* has its beats prolonged during two hours when immersed in the mixture NaCl + CaCl<sub>2</sub> (.418 & .013 M) pH 7,5.
7. Solutions 10 times more concentrated than solution 4 produces some irregularities in the beating of the *C. danae*-heart. The heart does not stop when these solutions are tertiary or quaternary. The most important irregularity is the increase of frequency. Removal of potassium chloride from the tertiary or quaternary mixture determine retardment of the rhythm. Exclusion of calcium chloride produces distolic arrest.

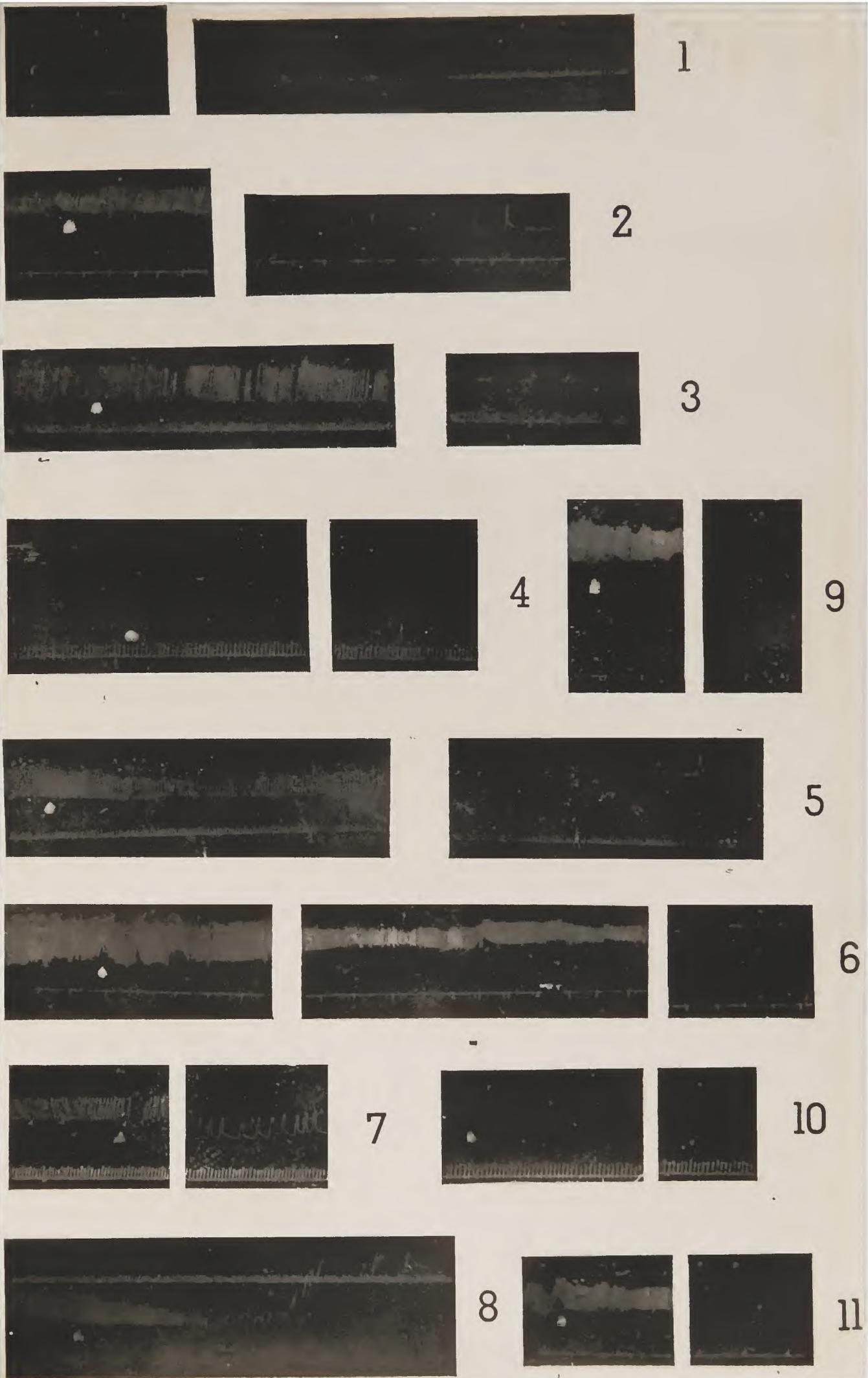
### B I B L I O G R A F I A.

- Balss, H. 1926. Decapoda, em Grimpe & Wagler, Tierwelt der Nord- und Ostsee, p.10, f. 2, pp. 9-112, Leipzig. Cole, W. H. 1940. The Composition of Fluids and Sera os some Marine Animals and of the Sea Water in which they live. J. Gen. Physiol., v. 23, n. 5, pp. 575-584, New-York. 1941. A Perfusing Solution for the Lobster (*Homarus*) Heart and the Effects of its constituent ions on the Heart. Ibid., v. 25, n. 1, pp. 1-6. 1941a. The Calcium and Chloride Content of Lobster Serum as affected by Dillution of the environmental sea Water. Bull. Mount Desert Island, pp. 22-24, Tremont. Cole, W. H., Helfer, R. G. & Wiersma, C.A.G. 1939. A Perfusing Solution for the Crayfish Heart and the Effects of its Constituent ions on the Heart. Physiol. Zool., v. 12, n. 4, pp. 393-399, Chicago. Cole, W. H. & Kazalski, L. A. 1939. A Perfusing Solution for the Lobster Heart and the Effects of its Constituent ions on the Heart Bull. Mount Desert Island, Biol. Lab., 1939, pp. 40-46. Cole, W. H. & Parker, B. 1940. Further Studies on Perfusing Solutions for the Lobster Heart. Ibid. 1940, pp. 38-40. Hogben, L. 1925. Studies on the Comparative Physiology of the Contractile Tissues. I. The Action of Electrolytes on Invertebrate Muscle. Quart. Journ. Exp. Physiol., v. 15, n. 3-4, pp. 263-317, London. Lochhead, M. S. & Newcombe, C. L. 1942. Methods of Hatching Eggs of the Blue Crab, Virginia Journ. Sc. v. 3, n. 2-3, pp. 76-86, Virginia. Prenant, M. 1933. Geographie des Animaux, 199 pp. Paris. Salomé Pereira, R. 1944. Sobre a composição mineral do sangue do *Callinectes danae* Smith e sobre a de um liquido para perfusão. Bol. Fac. Fil., Ciên. Letras Univ. S. Paulo XLIII, Zoologia n. 8, pp. 147-149, São Paulo. 1945. Estudos sobre a Composição da água do mar e do sôro do sangue de *Callinectes danae* Smith, Ibidem, Zoologia n. 9, pp. 69-86. Sandoz, M. & Rogers, R. 1944. The Effect of Environmental Factors on Hatching, Moulting, and Survival of Zoea larvae of the Blue Crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. Ecology, v. 25, n. 2, pp. 216-228, Brooklyn, N. Y. Sawaya, P. 1943. Sobre a ocorrência da Acetilcolina no tecido cardíaco de *Callinectes danae* Smith e seu efeito sobre o coração deste Crustaceo Decápodo. Bol. Fac. Fil., Ciên. Letr. Univ. S. Paulo XXXII, Zoologia n. 7, pp. 261-303, 5 t.; São Paulo. 1944. Solução perfusora para *Callinectes danae* Smith (Crustacea-Decapoda). Ibid. XLIII, Zoologia n. 8, pp. 151-160, 1 t. Schellenberg, A. 1928. Decapoda, em Dahl, Tierwelt Deutschlands, parte 2, 146 pp. Jena. Schultz, B. 1932. Hydrographie d. Nord- u. Ostsee, em Grimpe & Wagler, Tierw. d. Nord- u. Ostsee, parte 1, f. d2, pp. 46-88, Leipzig. Wells, G. P. 1928. The Action of Potassium on Muscle-Preparations from Invertebrates. Journ. Exp. Biol. v. 6, n. 3, pp. 258-282, London. Zood, A. & Slome, D. 1928. The Relation of Electrolytes to the Cardiac Rhythm of *Palinurus* (*Jasus*) *lalandii* and *Octopus horridus*. Ibid., v. 6, n. 1, pp. 87-95, 1 t.

**EXPLICAÇÃO DOS GRAFICOS.****Perfusões do coração de *C. danae*.**

- Fig. 1 — Solução 1 (NaCl .429; KCl .012; CaCl<sub>2</sub> .017; MgCl<sub>2</sub> .017). Tempo de perfusão 60 minutos.
- Fig. 2 — Solução 3 (NaCl .448; KCl .013; CaCl<sub>2</sub> .014; MgCl<sub>2</sub> .019). Tempo de perfusão 30 minutos.
- Fig. 3 — Solução 5 (NaCl .443; KCl .012; CaCl<sub>2</sub> .016; MgCl<sub>2</sub> .017). Tempo de perfusão 45 minutos.
- Fig. 4 — Solução 4 (NaCl .418; KCl .012; CaCl<sub>2</sub> .013; MgCl<sub>2</sub> .017). Tempo de perfusão 6,5 horas.
- Fig. 5 — Solução 2 (NaCl .429; KCl .012; CaCl<sub>2</sub> .017; MgSO<sub>4</sub> .016). Tempo de perfusão 30 minutos.
- Fig. 6 — Solução 6 (NaCl .418; KCl .012; CaCl<sub>2</sub> .013; MgCl<sub>2</sub> .016; MgSO<sub>4</sub> .001). Tempo de perfusão 70 minutos.
- Fig. 7 — Solução 11 (NaCl .418). Tempo de perfusão 40 minutos.
- Fig. 8 — Solução 12 (KCl .012). Tempo de perfusão 55 segundos.
- Fig. 9 — Solução 13 (CaCl<sub>2</sub> .013). Tempo de perfusão 15 minutos.
- Fig. 10 — Solução 14 (MgCl<sub>2</sub> .017). Tempo de perfusão 10 minutos.
- Fig. 11 — Solução 14 (idem). Tempo de perfusão 25 minutos.

Todas as soluções são molares.





# Contribuição para a Fisiologia dos sistemas respiratório e circulatório de *Siphonops annulatus* (*Amphibia-Gymnophiona*) \*

por ERASMO GARCIA MENDES

1.º Assistente

1. Introdução .....	25
2. Posição dos problemas .....	27
3. Métodos de pesquisa .....	31
4. Parte experimental:	
a) Consumo de O <sub>2</sub> , eliminação de CO <sub>2</sub> e quociente respiratório de <i>Siphonops annulatus</i> : íntegros, com supressão da respiração pulmonar por traqueoectomia parcial e com apenas respiração cutânea .....	32
b) Mecanismo do enchimento dos pulmões e papel das oscilações gulares .....	47
c) Mecanismo da circulação intracardiaca .....	54
5. Resumo e resultados .....	58
6. Summary .....	60
7. Bibliografia .....	62
8. Estampas .....	64

## 1. INTRODUÇÃO.

Alto grau de especialização atingiram as investigações relativas ao funcionamento dos diferentes sistemas orgânicos nos Anuros e nos Urodelos, principalmente na primeira dessas duas ordens de Anfíbios. De fato, as pesquisas realizadas em algumas espécies européias do gênero *Rana*, tornaram-n'as de longa data animais tradicionalmente usados nos cursos de fisiologia. Nos países em que elas não ocorrem, encontram-se ainda nos Anuros seus melhores substitutos. E' precisamente o que se dá entre nós, onde espécies dos gêneros *Bufo* e *Leptodactylus* têm sido objeto de inúmeros trabalhos fisiológicos principalmente executados nos laboratórios dos professores A. e M. Ozório de Almeida e F. Moura Campos.

---

\* Tese inaugural para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Bem diverso é o caso dos *Gymnophiona*, ordem ainda muito mal conhecida fisiologicamente. E' Werner (1931, p. 202) quem o afirma, na última resenha publicada sôbre êstes interessantes Anfíbios, ao assinalar que "sôbre a fisiologia dos *Gymnophiona* muito pouco se sabe, em virtude de terem sido pesquisados muito raramente animais vivos". Os hábitos singulares, a distribuição geográfica especial e, particularmente, a não ocorrência dos mesmos nas proximidades dos grandes centros zoológicos concorreram sobremaneira para dificultar a aplicação dos métodos adequados à solução dos vários problemas fisiológicos que nêstes, como nos demais Anfíbios, tão valiosos são para a Fisiologia Comparativa. Morfológicamente, no entanto, foram os Ginofiônos bastante estudados, numerosas tendo sido as publicações que vieram a lume, principalmente a partir de 1879, data do trabalho fundamental de Wiedersheim. De passagem, poderiam ser citadas as obras de P. e F. Sarasin (1887-1889) sôbre *Ichthyophis glutinosus*; de Fuhrmann (1912) e de Baer (1937) sôbre *Typhlonectes*; de Seshachar (1939) e Rasmawami (1941) sôbre *Uraeotyphlus*, e, finalmente, os exaustivos estudos que, em várias ocasiões, Harry Marcus e seus colaboradores fizeram em *Hypogeophis*. O pouco que se conhece sôbre o funcionamento dos vários órgãos dos Ginofiônos e que consta dos tratados de Fisiologia Comparativa (Winterstein 1921; Bethe e outros 1927; Jordan 1927; Rogers 1931; Buddenbrock 1937, etc.) ou das publicações referentes aos Anfíbios em geral, tais como a de Noble (1931), tem sido mais propriamente fruto de considerações teóricas com base em estudos morfológicos executados em material nem sempre bem fixado.

Ocorrendo *Siphonops annulatus* (*S. an.*), dentre os Ginofiônos que caracterizam a região neotrópica, com relativa abundância em vários pontos do Brasil, foi escolhido, desde 1937, no Laboratório de Fisiologia Geral e Animal do Departamento de Zoologia da Universidade de S. Paulo, para o estudo regular e sistemático de alguns pontos de sua biologia. Para tanto foi estabelecido um programa de pesquisas que abrange, principalmente, a ecologia e a fisiologia dêste Anfíbio. Depto do programa referido, coube-me, por sugestão do Prof. Paulo Sawaya, o estudo de alguns pormenores relativos ao funcionamento dos aparelhos respiratório e circulatório do *S. an.*, tendo já, em trabalho anterior (Mendes 1941), abordado questões referentes a órgãos respiratórios acessórios e à respiração cutânea. As informações conseguidas nessa pesquisa e os novos problemas que a mesma deixou entrever forneceram-me o ensejo de prosseguir na análise experimental da respiração e, também, da circulação do *S. an.*, tanto mais que se me apresentava a oportunidade de dispor de animais vivos em abundância.

No presente trabalho, uma vez admitida a possível existência de órgãos respiratórios acessórios (Mendes 1. c., p. 297), à

vista de pronunciados indícios de respiração cutânea em *S. an.* (Sawaya 1941, p. 221-223; Mendes 1. c., p. 297) e, finalmente, com base em dados de Sawaya (1940 e 1941) sôbre a morfologia e a fisiologia do coração dêste Ginofiôno, tive em mira principalmente as seguintes questões:

1. Verificar o comportamento dos *S. an.* submetidos à traqueotomia parcial, determinando as alterações operadas no consumo de  $O_2$ , eliminação de  $CO_2$  e quociente respiratório motivadas por êsse método de supressão da respiração pulmonar.
2. Determinar, mediante paralisação por anestesia dos movimentos da região gular, a intensidade da respiração cutânea.
3. Análisar o mecanismo de enchimento dos pulmões e o significado das oscilações gulares.
4. Estudar o mecanismo da circulação intracardiaca relacionado com as possibilidades respiratórias do *S. an.*

## 2. POSIÇÃO DOS PROBLEMAS

Excetuando-se os representantes do gênero *Typhlonectes*, que habitam permanentemente a água (Fischer 1880, p. 217; Fuhrmann 1912, p. 112), os Ginofiônos são animais que vivem em geral no sub-solo. Devem ser considerados (Hesse 1924, p. 27), por via de regra, como "animais aéreos", na sub-categoria dos "animais de ar húmido". O *habitat* dêsses Anfíbios, pouco freqüente entre os representantes dessa classe de Vertebrados, constitue, naturalmente, motivo para se indagar se são aquí aplicáveis, no que concerne à respiração, os fatos já estabelecidos, com certo rigor, nos Urodelos e Anuros. Numerosos trabalhos experimentais provaram, nos Anuros principalmente, ser a respiração pela pele muitíssimo mais importante que a respiração pulmonar. As clássicas pesquisas de Krogh (1904, pp. 358, 361, 416) indicaram que a respiração cutânea na rã européia é aproximadamente constante durante todo o ano, apenas aumentando consideravelmente a eliminação de  $CO_2$  durante o período da desova. Pelo contrário, a troca de gases pelos pulmões é muito variável, dando-se no inverno diminuta eliminação de  $CO_2$ . Esses dados foram posteriormente confirmados por Dolk e Postma (1927), os quais, além disso, chegaram à conclusão (1. c., p. 440) de que o funcionamento dos pulmões em *Rana temporaria* se acha inteiramente subordinado à respiração cutânea. Dada a grande permeabilidade dos pulmões ao oxigênio, a tomada dêsse elemento torna-se função da sua tensão no sangue que circula pelas paredes dos alvéolos. Já a velocidade de difusão do oxigênio pela pele depende da tensão do gás no meio exterior. Dêste modo, baixando esta última, menos oxigênio é tomado ao nível do integumento e, como consequência, o sangue que circulará pelos alvéolos terá uma menor tensão do elemento em questão, o qual será então absorvido em maior escala do ar alveolar e vice-versa. Assim, o consumo de oxigênio pelos pulmões depende, evidentemente, da respira-

ção cutânea, executando êsses órgãos nos Anuros, no dizer de Dolk e Postma, o que esta última lhes permite.

Exceção feita de alguns indícios experimentais de um intenso desprendimento de  $\text{CO}_2$  pela pele em *S. an.* (Mendes 1941, p. 297), não foram encontrados na literatura à mão dados experimentais sobre a respiração cutânea nos Ginofiônos. O que se lhes tem atribuído neste particular, baseia-se nos dados fornecidos exclusivamente pela morfologia. Os Sarasin (1. c., p. 66-70) descreveram na larva de *Ichthyophis glutinosus* complicados canaliculos em comunicação, de um lado, com o exterior e, do outro, com capilares subcutâneos, a que atribuíram significado respiratório. Não conseguiram, porém, descobrir no adulto a comunicação dos mesmos com a rede capilar subepidérmica. Fuhrmann (1. c., p. 128-129) informa existir em *Typhlonectes natans* capilares dispostos em rêsdes intra-epidérmicas muito serradas. Marcus (1923, p. 332), por sua vez, negando grande eficiência à respiração pulmonar em *Hypogeophis* afirmou que a "pele representa importante fator na troca de gases". Mais tarde, todavia, negou terminantemente a respiração cutânea (1925, p. 99), à vista da espessura do tegumento. No tocante a *S. an.*, também os dados da morfologia forneceram indícios da existência de respiração pela pele. Assim é que Sawaya (1941, p. 222) descreveu neste animal intensa rede capilar cutânea.

A preponderância da respiração cutânea sobre a pulmonar nos Anfíbios, modernamente fundamentada em dados experimentais quantitativos, já tinha sido há muito entrevista por vários autores (Winterstein 1921, p. 201), os quais, pelas mais diversas técnicas conseguiram provar a sobrevivência, de Anuros principalmente, à supressão da respiração pulmonar. A descoberta, no fim do século passado, de Urodelos apulmonados ou com apenas vestígios de sacos pulmonares, veio reforçar a convicção dos pesquisadores de que nos Anfíbios cabe, principalmente, ao tegumento a função da troca de gases. A tal ponto foi levada essa crença que, recentemente, Vandervael (1933, p. 606) admitiu que, na rã européa, os pulmões seriam mais propriamente órgãos destinados à reserva de ar, que seria utilizada, principalmente, como corrente aérea na produção do coxo. Todavia, como se verá, a análise quantitativa da troca de gases, embora mantendo a preponderância da respiração cutânea sobre a pulmonar, com um certo rigor tem já demonstrado que a pele sobretudo elimina  $\text{CO}_2$ , cabendo aos pulmões absorver mais  $\text{O}_2$  do que o  $\text{CO}_2$  que desprendem.

Os Ginofiônos, por via de regra, possuem o pulmão esquerdo atrofiado. Apenas em *Typhlonectes natans* (Fuhrmann 1912, p. 117) são os dois órgãos igualmente desenvolvidos. Sobre a eficiência dos pulmões destes Anfíbios como órgãos respiratórios, é de se mencionar a opinião de Marcus (1923, p. 332) de que os pulmões de *Hypogeophis* não devem ser particularmente aptos para a res-

piração, por ser mediocre a superfície dos mesmos confrontada com a da pele.

Dada a possibilidade de imobilizar os animais por destruição da medula ou do encéfalo, tem sido viável nos Anuros a medida isolada e concomitante das respirações cutânea e pulmonar. A introdução e fixação de uma cânula na laringe, através da qual se fazem insuflações rítmicas de ar nos pulmões, assegura nesses casos o funcionamento destes órgãos. Razões muito variadas mostram que essa técnica de lesar as vias nervosas não é aplicável a muitos Anfíbios. Em tais casos, recorre-se a outros processos, entre os quais se destaca a anestesia não muito profunda que, suprimindo os movimentos da região gular ou paralisando os próprios pulmões, principalmente pelo primeiro dos motivos apontados, deixa ao animal apenas a possibilidade de utilizar o integumento como superfície respiratória. A escolha de um anestésico conveniente torna, por vezes, esse processo talvez até mais vantajoso do que os de supressão cruenta da respiração pulmonar (extirpação dos pulmões, ligadura da traquéa ou das aa. pulmonares, etc.) ou da introdução da cânula na laringe em animal espinhal ou descerebrado. De fato, nêstes dois últimos casos, à medida da respiração cutânea poderia objetar-se que inclui também as trocas possivelmente realizadas pelas mucosas buco-esofágica (cf. por exemplo, o aparelho de Dolk e Postma l. c., p. 425 e segs.). A supressão dos movimentos da região gular pela anestesia anula o mecanismo de bomba aspirante-premente, mediante o qual os Anfíbios enchem os pulmões, evitando qualquer entrada de ar através das narinas. Criticável, todavia, é a técnica, sobretudo pela toxidez sempre existente do anestésico e pelo fato de não permitir a medida concomitante de ambos os tipos de respiração. Além disso, a supressão da respiração pulmonar por tal método, como se verá, levaria, segundo alguns autores, a um funcionamento compensativo da respiração cutânea, o que diminuiria o significado das medidas desta última.

A mecânica da respiração pulmonar nos Anfíbios e o significado das chamadas "oscilações gulares" (*Kehloscillationen*) constituem assuntos já amplamente debatidos no que respeita aos Anuros e Urodelos. Ainda aqui, a Rã européa tem, de preferência, servido como objeto de estudo e o que tem sido estabelecido sobre o modo por que os Anfíbios enchem os pulmões deve-se, sobretudo, às pesquisas de Gaupp (1896).

Ocupou-se este autor principalmente da elucidação da atividade muscular que proporciona os movimentos gulares e a abertura e fechamento do ádito laríngeo durante as várias fases do processo respiratório pulmonar. Outros pesquisadores efetuaram, por variadas maneiras, o registro gráfico do enchimento dos

pulmões (Bábak 1921, p. 707). Particular atenção foi voltada às oscilações gulares que se executam durante a pausa respiratória dos Anuros e Urodelos, surgindo a proposito das mesmas acesa controvérsia. Admitem uns que as referidas oscilações serviriam também para o enchimento dos pulmões, ao passo que outros negam tal asserção, alegando que apenas proporcionariam, durante a pausa respiratória, a ventilação da cavidade bucal e da faringe, cujas mucosas seriam séde de intensa respiração. A favor desta última hipótese foi invocado o fato de que as formas apulmonadas de Urodelos possuem acentuadíssimas oscilações gulares, a par de riquíssima vascularização das mucosas mencionadas. Todavia, não foi demonstrada experimentalmente a função respiratória da boca e do trecho inicial do esôfago.

Devem-se a Harry Marcus e colaboradores, principalmente, os dados até agora existentes sôbre a mecânica da respiração pulmonar dos Ginofionos. Com base sobretudo nas verificações de Gehwolf (1923) sôbre a laringe de *Hypogeophis* e nas suas próprias, Marcus (1923) forneceu para êsse Apodo uma descrição do modo como enche os pulmões. Não dispondo de material vivo, confessa que seguiu principalmente o clássico trabalho de Gaupp (ap. Marcus 1923, p. 331) sôbre *Rana* para as deduções que foi tirando acerca do papel e funcionamento dos vários músculos e demais órgãos que lhe pareceram de importância no mecanismo da ventilação pulmonar. O processo por êle descrito assemelha-se fundamentalmente ao dos Anfíbios em geral. Todavia, ressaltou dois pontos de grande interêsse para a compreensão do fenômeno os quais até então não tinham sido focalizados com precisão. O primeiro refere-se à maneira pela qual o ar aspirado do exterior é impedido, na inspiração, de sair pelas narinas, descrevendo uma válvula na altura da desembocadura das coânas. O outro diz respeito ao modo por que na inspiração se oclue o esôfago, ficando assim de todas as aberturas da cavidade bucal, visto que a boca está fechada, apenas aberta a fenda laríngea, por onde o ar pode escoar-se. O problema da oclusão do esôfago na inspiração, como observa Auersbach (1930, p. 113), até a época do trabalho de Marcus, tinha sido um tanto descuidado por parte dos que se interessaram pelo mecanismo da ventilação pulmonar nos Anfíbios. Cuidou igualmente Marcus (p. 339) do mecanismo de abertura e fechamento da rima laríngea. Finalmente, quanto às oscilações gulares (p. 341), expressa-se o autor um tanto especulativamente, porquanto não observou animais vivos. Diz apenas que a grande importância que tem sido admitida para as mesmas carece de sentido. A ser provada sua existência em *Hypogeophis*, serviriam, afirma, analogamente a uma faixa ciliada que descreveu colocada medianamente no pulmão, para produção de um movimento de ar para dentro do órgão.

Intimamente correlacionados são, nos Anfíbios, a respiração difusa, realizada por várias superfícies do organismo, e o sistema circulatório, em particular, a estrutura do coração. Pela presença de uma válvula espiral no truncus arteriosus e de um septo endatrial completo, pretende-se, principalmente em Rã, explicar a separação dos sangues no percurso intracardiaco. Tal o fundamento da teoria clássica de Brücke, modificada principalmente por Sabatier. Em outros Anfíbios, a ausência por vezes notada de válvula espiral no truncus ou de outro mecanismo equivalente impossibilita a aplicação dessa teoria, para explicar a circulação cardíaca. Porém, mesmo com relação à Rã, recentemente Vandervael (1933) demonstrou, experimentalmente, a ineficiência da válvula espiral como selecionadora das duas qualidades de sangue oriundas do ventrículo. Além disso, por uma ampla análise do conjunto das relações circulatórias, deixou patente ser o coração desse Anuro atravessado desde o ventrículo por sangue misto.

Quanto aos Ginofiônos, segundo vários autores, existem em muitas espécies septação entre os átrios e, no truncus, formações que, como tem sido admitido para a Rã, dirigiriam as duas qualidades de sangue para as rampas respectivas. Assim é que Acolat (1939, p. 7) as menciona em *Ichthyophis glutinosus*, *Siphonops paulensis* e *Chthonerpton indistinctum*. Marcus (1935, p. 97) aponta igualmente septação endatrial em *Hypogeophis* e uma prega espiral no truncus. É interessante ainda ter esse autor descoberto uma divisão parcial no ventrículo, pretendendo ter encontrado em *Hypogeophis* a transição entre o coração dos Dipnóicos e o dos Répteis. A estrutura e o coração de *S. an.* foi estudada recentemente por Sawaya (1940 e 1941), o qual confirmou as observações de Wiedersheim (1879, p. 78) quanto à incompleta septação endatrial. Além disso, anota aquele autor que no truncus é ausente qualquer formação que lembre morfológica ou funcionalmente uma prega espiral (1940, p. 237). Tais disposições morfológicas sugerem nitidamente, de um lado, a impossibilidade de se manter isolado nos átrios o sangue que foi arterializado nos pulmões e, de outro, que uma mesma qualidade de sangue é distribuída aos vasos que se originam no truncus. Todavia, somente com uma técnica experimental análoga à de Vandervael poder-se-ia comprovar esse fato. É o que se terá a oportunidade de ver no decurso deste trabalho.

### 3. MÉTODOS DE PESQUISA.

Os *S. an.* são provenientes de Terezópolis, Estado do Rio. No laboratório foram mantidos em terrários periodicamente umidecidos ou soltos pelo jardim, em cujos canteiros era fácil reencontrá-los. Para as experiências de determinação de troca de gases, como estes estudos abrangeram os meses de verão, época em que se dá a cópula e a desova (Sawaya 1937, p. 251), os animais foram selecionados de modo a evitar o quanto possível

a utilização de fêmeas fecundadas. Como se sabe, os *S. an.* não apresentam dimorfismo sexual externo. Em certos casos apenas, pelo número de pregas anelares e pelo comprimento (Sawaya 1937, p. 252), torna-se possível distinguir os machos. Todavia, na época mencionada, as fêmeas apresentavam-se nitidamente mais volumosas. Com base nesse pormenor, selecionei para as experiências, animais que na sua maioria eram machos. Tal fato ficou comprovado na quasi totalidade dos casos, ao sacrificar posteriormente os animais. Nos resultados, foram rejeitados os casos referentes a animais grávidos.

*S. an.* nos terrários do laboratório, ao que parece, permanece em jejum, porquanto até o momento não consegui estabelecer alimentação adequada. Para obtenção de exemplares o mais possível uniformes para as experiências, de um modo geral, os animais recém-chegados do seu *habitat* natural não eram logo utilizados. Estagiavam um certo tempo nos terrários. O mesmo proceder foi empregado com os exemplares retirados dos canteiros do jardim, pois, possivelmente, estes se achavam em condições melhores de nutrição. Desta maneira, os animais das experimentações estavam todos em condições de jejum semelhantes.

Os pormenores da técnica empregada para cada grupo de experiências serão relatados nos respectivos capítulos.

#### 4. PARTE EXPERIMENTAL.

- a) Consumo de  $O_2$ , eliminação de  $CO_2$  e quociente respiratório de *S. an.*: íntegros, com supressão da respiração pulmonar por traqueoctomia parcial e com apenas respiração cutânea.

##### *Experiências:*

- 1) Troca de gases de animais íntegros.

**Descrição do aparelho:** Consta de um tubo de vidro munido de duas tubuladuras laterais e aberto nas duas extremidades. A uma das tubuladuras fixou-se solidamente uma pera de borracha munida de câmara deformável, à outra uma tomada de borracha para a conexão com o coletor das amostras de gases. O bulbo de um termômetro foi colocado dentro do tubo, atravessando o instrumento uma das rolhas que obturaram as extremidades do aparelho. *S. an.* é lucífugo e de pele úmida, por essa razão o tubo foi envolvido por papel preto e umidecido internamente.

Colocado o animal no interior do tubo, esperava-se um certo tempo até que ficasse em repouso, o que se verificava através de uma janela existente no envoltório. Por repetidas insuflações renovava-se então o meio aéreo interno, afim de que no interior do tubo inicialmente reinasse mesma pressão que externamente. Nesse momento, colhia-se a amostra inicial da experiência por meio do frasco coletor de Bailey, calafetando-se em seguida completamente o aparelho. Com um aparelho de Haldane-Henderson-Bailey analisava-se a amostra colhida. O tempo de duração de cada experiência foi de 1 hora. Ao cabo desse período, com o frasco de Bailey, colhia-se nova amostra do ar contido no tubo. A existência de uma câmara deformável intercalada entre a pera e o tubo impedia, nessa ocasião, que o ar retirado viesse para o coletor sob tensão, pois à aspiração exercida por este abatiam-se as paredes da referida câmara. Dêste modo, o ar coletado constituía uma amostra bem homogênea, para o que aliás também contribuía o fato de que, antes da coleta, era o tubo movido em vários sentidos.

Afim de que o aparelho, durante o tempo da experiência, ficasse em local onde fossem mínimas as oscilações de temperatura, foi êle colocado em lugar sombreado, dentro de um aquário atravessado por água corrente,

TABELA 1

Eliminação de CO<sub>2</sub>, consumo de oxigênio e quociente respiratório de *S. an.* íntegros (valores reduzidos a 0°C e 760 mm)

## D E T E R M I N A Ç Õ E S

Ani- mais	Pesos (g.)	1.º			2.º			3.º			4.º			5.º		
		%CO <sub>2</sub>	%O <sub>2</sub>	Q. R.	%CO <sub>2</sub>	%O <sub>2</sub>	Q. R.	%CO <sub>2</sub>	%O <sub>2</sub>	Q. R.	%CO <sub>2</sub>	%O <sub>2</sub>	Q. R.	%CO <sub>2</sub>	%O <sub>2</sub>	Q. R.
S <sub>28</sub>	28	0.540	0.852	0.632	0.307	0.396	0.926	0.257	0.448	0.575	0.401	0.719	0.557	0.675	1.072	0.629
S <sub>24</sub>	20	0.802	1.106	0.725	0.173	0.422	0.409	0.349	0.667	0.523	0.418	0.628	0.665	0.413	0.506	0.816
S <sub>25</sub>	23	0.591	0.928	0.636	0.543	0.717	0.757	0.396	0.574	0.689	0.488	0.794	0.614	0.337	0.717	0.470
S <sub>26</sub>	30	0.680	0.850	0.800	0.860	1.430	0.601	0.484	1.190	0.406	0.710	0.910	0.780	0.380	0.840	0.452
S <sub>27</sub>	27	1.240	2.440	0.508	0.640	1.050	0.609	0.540	0.950	0.578	0.672	1.120	0.842	0.370	0.540	0.687
S <sub>28</sub>	25	0.710	1.410	0.503	0.500	0.820	0.609	0.460	0.910	0.509	0.430	0.480	0.957	0.440	1.068	0.411
S <sub>29</sub>	30	0.460	0.780	0.598	0.870	2.070	0.420	0.369	0.420	0.587	0.380	0.890	0.428	0.360	0.450	0.800
S <sub>30</sub>	32	0.640	0.980	0.653	0.660	1.890	0.329	0.280	0.310	0.903	0.270	0.640	0.421	0.610	0.460	1.320
S <sub>31</sub>	25	0.630	1.310	0.480	0.330	0.450	0.773	0.370	0.560	0.650	0.500	0.580	0.862	0.590	0.780	0.756
S <sub>32</sub>	22	0.714	1.440	0.495	0.515	0.739	0.696	0.360	0.532	0.626	0.363	0.484	0.750	0.278	0.434	0.640
S <sub>41</sub>	45	0.387	0.577	0.670	0.350	0.445	0.786	0.411	0.634	0.648	1.156	1.840	0.622	0.978	1.743	0.561
S <sub>42</sub>	42	0.590	0.984	0.588	0.503	0.512	0.982	0.611	1.089	0.561	0.699	1.193	0.585	0.510	0.510	1.000
S <sub>43</sub>	40	0.693	1.129	0.614	0.535	0.786	0.680	0.664	1.009	0.658	0.478	0.596	0.802	0.892	1.175	0.759
S <sub>44</sub>	39	0.769	1.103	0.696	0.683	1.018	0.670	0.532	0.561	0.948	0.370	0.496	0.745	0.285	0.628	0.453
S <sub>45</sub>	38	0.525	0.654	0.802	0.504	0.607	0.830	0.870	0.899	0.977	0.731	0.919	0.795	0.429	0.611	0.702

TABELA 2

Eliminação de CO<sub>2</sub>, consumo de oxigênio e quociente respiratório de *S. an.* traqueotomizados (val. reduzidos a 0°C e 760 mm.)

## D E T E R M I N A Ç Õ E S

N.º Ani- male	1.º			2.º			3.º			4.º			5.º			6.º			7.º			8.º			
	%CO <sub>2</sub>	%O <sub>2</sub>	Q.R.																						
S <sub>24</sub>	0.239	0.341	0.700	0.297	0.263	1.129	0.179	0.196	0.913	0.271	0.366	0.740	0.303	0.376	0.806	0.180	0.240	0.750	—	—	—	—	—	—	—
S <sub>25</sub>	0.181	0.227	0.797	0.354	0.447	0.791	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S <sub>26</sub>	0.259	0.292	0.887	0.312	0.320	0.975	0.275	0.261	1.065	0.264	0.341	0.774	0.362	0.477	0.758	0.314	0.356	0.882	0.290	0.230	1.260	0.213	0.281	0.758	—
S <sub>27</sub>	0.259	0.326	0.794	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S <sub>28</sub>	0.309	0.409	0.755	0.244	0.278	0.881	0.326	0.244	1.336	0.298	0.298	1.000	0.451	0.596	0.750	0.339	0.297	1.141	0.127	0.145	0.875	0.358	0.384	0.934	—
S <sub>30</sub>	0.351	0.284	1.235	0.351	0.351	1.000	0.522	0.725	0.718	0.439	0.456	0.902	0.547	0.370	1.478	0.298	0.315	0.946	0.232	0.266	0.872	0.851	0.282	1.244	—
S <sub>31</sub>	0.299	0.256	1.167	0.225	0.309	0.728	0.395	0.481	0.821	0.303	0.370	0.818	0.426	0.604	0.705	0.292	0.278	0.772	0.428	0.368	1.168	—	—	—	—
S <sub>32</sub>	0.256	0.222	1.153	0.187	0.179	1.044	0.179	0.130	1.376	0.274	0.283	0.932	0.313	0.349	0.896	0.315	0.443	0.711	0.271	0.367	0.738	—	—	—	—

NOTA: Os pesos dos animais acham-se mencionados na Tab. 1.

de tal modo que o tubo ficasse a uns 20 cms acima do nível d'água. Foi possível, assim, a obtenção dentro do aparelho de uma temperatura no máximo 3°C superior àquela do fundo dos terrários à mesma hora.

Como se vê, constitue o aparelho empregado um tipo mixto de partes rígidas e deformáveis, podendo ser catalogado entre os "sistemas fechados". De um certo modo, lembra o dispositivo usado por Goulston (1931, p. 56).

*Dosagens:* Foram escolhidos 15 *S. an.* ( $S_{23}$ - $S_{37}$  e  $S_{41}$ - $S_{45}$ ), entre os que me pareceram em boas condições, para esta série de experiências. O comprimento dos animais variou de cms. 29,5-37,5. Cada animal foi submetido a 5 experimentações. Os resultados estão expressos na tabela n. 1.

2) Sobrevivência de *S. an.* à supressão da respiração pulmonar. Medida da troca de gases nêsse estado.

Uma vez conhecidos os valores médios para o consumo de  $O_2$ , eliminação de  $CO_2$  e quociente respiratório de *S. an.* íntegros, procurei, em alguns dêstes, verificar as modificações induzidas na troca de gases pela supressão da respiração pulmonar. A supressão consistiu na eliminação do acesso de ar ao pulmão por traqueoectomia parcial.

As diferentes técnicas, preconizadas por diversos autores para suprimir a respiração pulmonar, geralmente dizem respeito à Rã. Das mesmas fornece Winterstein (1921, p. 195 e seg.) extenso resumo. Em geral não são aplicáveis a *S. an.* O fechamento artificial da glote é nêsse animal de difícil obtenção, em virtude de sua localização (Fig. 1) e suas diminutas dimensões. Além disso, tal obturação nunca é tão completa, o que torna o método inseguro. A secção do vago foi afastada por ser quasi impraticável sem causar grande dano ao animal. A ligadura das artérias pulmonares, ao nível de sua origem no truncus ou a extirpação dos pulmões oferece em *S. an.* sérias dificuldades. Como é sabido, *S. an.* possui o pulmão esquerdo atrofiado (Fig. 8), mas, em compensação, o direito é bastante longo, de tal modo que dificulta sobremaneira a exerece, ainda mais por estar dorsalmente fixado por um meso.

Em animais anestesiados com uretana a 5%, na dose de  $cm^3$  1-2, processou-se a traqueoectomia, através de uma pequena incisão da pele mediãna ventral, do 3.º ao 6.º anel em média, sendo a traquéia ligada em dois pontos distantes de cêrca de cms. 0.5-1.0, antes da extirpação do trecho compreendido entre as duas ligaduras.

Os *S. an.* operados eram colocados em recipientes com fundo revestido por algodão banhado com Ringer para Anfíbios e os próprios animais recobertos com algodão igualmente umidecido. Com isso procurei estabelecer condições de assepsia que não poderiam ter nos terrários. De tempo em tempo (nunca em intervalo superior a 12 horas), a ferida era desinfectada com líquido de Dakin, com o que conseguí evitar a gangrena que, nas primeiras experiências, vitimou a totalidade dos operados. Os animais mantidos nas condições descritas sobreviveram até o término dêste trabalho, cicatrizando-se a ferida. Operados entre 28 a 30 de janeiro do corrente ano, até esta data (30-9-44) alguns são mantidos. Outros foram sacrificados 2 mêses após, para avaliação dos efeitos da traqueoectomia. À autópsia, apresentaram-se os pulmões abatidos, murchos e com apenas traços de isquemia,

Na verdade, esta não era de se esperar em grande escala, porquanto a circulação foi mantida.

Cessada a ação da anestesia, procurei ver como se comportavam alguns traqueoectomizados no terrário. Intentavam, de início, enterrar-se, mas, posteriormente, retornavam à superfície, onde ficavam enrolados sobre si próprios. Comportam-se também desse modo os sobreviventes que ainda conservo, já com a ferida completamente cicatrizada. Ficam, no máximo, semi-enterrados. Posteriormente à operação, sobrevêio intensa descamação da epiderme, verdadeira muda. Que isso não foi consequência do emprego do anestésico prova o fato de outros animais, anestesiados para outros fins, não terem apresentado o fenômeno. Notável foi o aumento dos movimentos inspiratórios que, normalmente, se intercalam com menor frequência entre as chamadas oscilações gulares. O animal operado como que se esforçava para vencer o obstáculo à passagem de ar pela traquéia. Tão forte era a pressão do ar dentro do trecho cranial do órgão, que se ouvia perfeitamente um forte estalido. Tal não ocorre no normal. Neste, nem mesmo nos mais acentuados movimentos inspiratórios, percebe-se vibração sonora como resultado da entrada do ar que se dirige aos pulmões. Considero este fato mais um indício do êxito da operação. Outro pormenor a assinalar refere-se à grande diminuição de peso nos animais sobreviventes, em média 10 grs em dois meses. Tal pareceu-me, porém, não se atribuir exclusivamente à supressão da respiração pulmonar. Por certo ela deve ter contribuído, mas o trauma operatório, o fato de o animal ter permanecido em jejum e em condições ambientais diferentes das do natural, a meu vêr, foram talvez fatores preponderantes nesse emagrecimento. Além disso, uma boa parte dos sobreviventes foi usada amiúde nas experiências para determinação da troca de gases, tendo assim sofrido as inconveniências da manipulação, geralmente nociva aos *S. an.*

Dos 15 *S. an.* empregados na determinação de valores médios da troca normal de gases, oito foram destinados à redeterminação da referida troca após traqueoectomia, 10 dias após o encerramento das experiências da primeira série. Operados, uma vez cessada a ação do anestésico, foram deixados dois dias em descanso e, ainda com a ferida não completamente cicatrizada, foram colocados no aparelho para a determinação de valores médios para a troca de gases.

Não obstante o cuidado em introduzir os animais no tubo, inicialmente havia forte agitação dos operados e, em consequência das contorsões, a ferida novamente se abria. Em dois casos isso foi fatal aos animais.

Assim é que  $S_{27}$  veio a sucumbir após uma única determinação e  $S_{25}$  após duas. Os demais resistiram bem e puderam ser colocados no aparelho um número suficiente de vezes de modo a permitir um confronto entre os estados pré e post-operatórios. Os resultados das determinações vão consignados na tabela n. 2.

3) Avaliação da respiração cutânea pela técnica da supressão, por anestesia, dos movimentos da região gular.

Como é do conhecimento geral, a anestesia afeta acentuadamente o funcionamento respiratório. Nos Anfíbios tem sido utilizada como modificadora da respiração no sentido de paralisar a respiração pulmonar ou, melhor ainda, impedir da parte do ani-

mal qualquer aspiração do ar exterior pelas narinas. Dêste modo, com seu auxílio, evita-se igualmente chegada de ar ao contato das mucosas bucal, faríngea e esofágica, às quais se tem atribuído, nos Anfíbios, papel respiratório. O animal anestesiado disporá então sómente de integumento para o desempenho da função. Constitue, pois, a anestesia, um dos processos para a avaliação, isoladamente, da respiração cutânea. Não apenas êsse, mas outros métodos têm sido aventados para tal propósito. Dêles encontra-se em Winterstein (1921, p. 201) longa resenha crítica. Krogh (1904, pp. 338-344, 352) utilizou-se de um aparelho em que o animal, colocado numa câmara, se põe, por meio de uma cânula solidamente fixada na laringe, em posição de se medir a troca de gases pulmonar, ao passo que os demais tipos de respiração são avaliados por análises do ar retirado da câmara. Tal aparelho, mesmo com os aperfeiçoamentos posteriormente introduzidos por Dolk e Postma (1927, p. 422), é inadequado para o *S. an.* Por isso, preferí, a exemplo do que fez Goto (1934, p. 186 e seg.) na Salamandra, o emprego da anestesia para avaliar a respiração cutânea.

Desde logo evitei os anestésicos inalantes, os quais, especialmente o éter, como foi demonstrado por Sawaya (1940, p. 215), provocam grande excitação do animal com forte secreção glandular cutânea. O mesmo se dá com imersão do *S. an.* em soluções anestésicas, e daí a preferência da via intraperitoneal, de que me vali com êxito.

*S. an.*, recebendo intraperitonealmente de 1 a 2 cm<sup>3</sup> de uma solução de uretana a 5%, apresenta relaxamento do tonus muscular depois de 20 minutos, mostrando, ainda por êsse tempo, movimentos da região gular. Êstes, aos poucos, vão diminuindo, não se acelerando nem mesmo à excitação com picada de agulha. Ao cabo de 3 horas, em média, cessam êles completamente. Os batimentos cardíacos, perceptíveis na região pré-cordial, também diminuem de intensidade e de freqüência, apresentando, no entanto, de tempo em tempo, certos períodos de aceleração. Sendo a aspiração do ar pelas narinas, em *S. an.* como nos demais Anfíbios (ver o cap. seg.), condicionada pelos movimentos do assoalho da boca, cessados tais movimentos não mais se dá a entrada de ar na cavidade bucal. Nessa hipótese, *S. an.* em tais condições, apenas tem em atividade a respiração pela pele. À parte as inconveniências próprias da anestesia, penso que os resultados sôbre as trocas de gases aqui obtidos, servirão para avaliar bastante aproximadamente, a intensidade da respiração cutânea.

Dos 15 *S. an.* empregados na primeira série de experiências dêste trabalho, foram escolhidos 5 (*S*<sub>41</sub>-*S*<sub>54</sub>) para a determinação da troca de gases através do integumento. Todos suportaram bem as sucessivas doses de uretana com que foram injetados durante o decurso das várias experiências.

Voltaram à normalidade dois dias após. Em alguns casos, foi um mesmo período de anestesia aproveitado para sucessivas medidas de troca de gases. A tabela n. 3 fornece os resultados das experiências.

### *Discussão dos resultados.*

1. A idéia de medir as trocas gasosas nos *S. an.* foi consequência do êxito obtido com a traqueoectomia dos animais e a sobrevivência destes a essa técnica de suprimir funcionalmente a respiração pulmonar. Pretendi, desse modo, avaliar comparativamente as alterações sobrevindas no consumo de  $O_2$  e eliminação de  $CO_2$ , após a eliminação do funcionamento de órgãos tão importantes para a respiração, quais sejam os pulmões. Bastava-me, para tanto, a obtenção de termos médios para a troca de gases em condições normais e post-operatórias, afim de confrontá-los. Dada a simplicidade do dispositivo empregado para obtê-los, não constituem êles, é óbvio, dados absolutos sobre a respiração de *S. an.* Foram, no entanto, suficientes para permitir avaliar, e até quantitativamente, as consequências da traqueoectomia parcial e, também, da extinção dos movimentos da região gular pela anestesia.

Sob determinados aspectos, porém, corresponde o aparelho aqui empregado às condições relativamente próximas do natural. Não era possível manter isento de vapor d'água o interior do tubo-câmara, porquanto *S. an.*, animal de pele úmida, é muitíssimo sensível ao ar seco. O ambiente de ar confinado a que foi submetido está de acordo com o tipo de vida de *S. an.*, Animal endógeo, nas galerias onde vive no sub-solo não deve existir grande circulação pelo menos as do terrário do laboratório não mantêm comunicação direta com o exterior. As temperaturas reinantes no interior do aparelho durante as experiências estão dentro dos limites das oscilações suportáveis pelo animal na natureza:  $16^{\circ}C$ - $28^{\circ}C$ . Envolvendo com papel preto o tubo-câmara, foram também evitados os prejuízos respiratórios que, segundo vários autores (Merker 1926, Kalmus, 1933, etc.) a luz causa em animais de pele úmida.

As experiências se iniciaram reinando no interior do tubo uma concentração de  $CO_2$  praticamente igual à do ar do laboratório. Tratando-se de um método de confinamento, no decurso da pesquisa, essa concentração tendia a aumentar constantemente. O  $CO_2$  eliminado pelo animal não foi absorvido por qualquer das técnicas usadas para êsse fim (sol. de KOH, cal sodada, etc.). Quiz, desta maneira, aproximar-me das condições que penso serem as naturais nas galerias onde vivem os animais.

A amostra final, como disse, dada a deformabilidade da câmara da pêra à aspiração exercida pelo coletor, era formada por ar retirado sem variação de tensão.

Constitue, naturalmente, matéria a ser pesquisada, determinar, com maior precisão, de que fatores realmente depende a medida rigorosa da troca de gases em *S. an.* Neste trabalho houve a intenção de não se afastar do que a observação revelou parecerem as condições próximas do natural. Não deixa de ser um tanto artificial o dispositivo usualmente empregado pelos autores para

**TABELA 3**  
 Eliminação de CO<sub>2</sub>, consumo de oxigênio e quociente respiratório de *S. an.*  
 anestesiados (valores reduzidos a 0°C e 760 mm.)

**D E T E R M I N A Ç Õ E S**

Ani- mais	Peso (g.)	1.º			2.º			3.º			4.º			5.º			6.º			
		%CO <sub>2</sub>	%O <sub>2</sub>	Q.R.																
S <sub>41</sub>	45	0.686	0.560	1.242	0.736	0.473	1.556	0.545	0.511	0.668	0.545	0.502	1.085	—	—	—	—	—	—	—
S <sub>42</sub>	42	0.567	0.476	1.191	0.698	0.545	1.280	0.446	0.389	1.146	0.442	0.419	1.054	0.598	0.566	1.056	0.474	0.460	1.030	—
S <sub>43</sub>	40	0.511	0.503	1.015	0.619	0.490	1.263	0.653	0.473	1.380	0.737	0.437	1.689	—	—	—	—	—	—	—
S <sub>44</sub>	39	0.381	0.374	1.018	0.442	0.306	1.444	0.521	0.504	1.033	0.555	0.410	1.353	0.570	0.366	1.557	—	—	—	—
S <sub>45</sub>	38	0.398	0.367	1.084	0.481	0.344	1.427	0.569	0.509	1.117	0.314	0.323	0.972	0.408	0.331	0.946	0.469	0.281	1.669	—

a medida da respiração dos Anfíbios, sobretudo porquê geralmente é enviado a êsses animais de pele úmida, ar isento de vapor d'água. Por certo, em tais casos, altera-se sensivelmente a respiração cutânea, tão importante nêsses Vertebrados. O proprio Winterstein, à vista desta e de outras artificialidades dos métodos modernos de pesquisa da troca de gases nos Anfíbios, atribue valor muito relativo aos dados fornecidos por Krogh, um dos mais famosos pesquisadores nêsse campo.

2. Não obstante a finalidade primordial da medida das trocas de gases de *S. an.*, íntegros ou não, visar essencialmente dar uma idéia em termos quantitativos das conseqüências da experimentação, é interessante analisar os resultados das medidas, mesmo porquê, ao que parece, constituem elas as primeiras relativas aos Ginofíônos.

Da interpretação dos dados da Tab. 1 revela-se que, entre indivíduos ou num mesmo indivíduo, é grande a variação da quantidade de  $O_2$  consumida num mesmo período de tempo. Não se pode dizer que, como era de se esperar, tenha variado o consumo proporcionalmente com o peso dos animais, porquanto em diversas ocasiões tal não se observou. É interessante notar, porém, que  $S_{41}$ , o *S. an.* de maior peso, mostrou, correspondentemente, o maior consumo médio e  $S_{24}$ , o menos pesado, acusou o menor consumo médio. Também quanto à eliminação do  $CO_2$  observa-se que houve grandes variações entre indivíduos ou num mesmo indivíduo, não sendo aqui possível igualmente relacionar os pesos dos animais com os valores obtidos. Acredito, porém, que tal se deva, em primeiro lugar, ao número talvez pequeno de dosagens com um mesmo animal. Somente um número maior forneceria uma média realmente significativa para a avaliação da proporcionalidade entre peso de um lado e consumo e eliminação de outro. É possível também que os animais, por circunstâncias não controladas, diminuíram certas vezes a intensidade da respiração pulmonar, aumentando-a outras. Sabe-se que nos Anfíbios o funcionamento dos pulmões sofre acentuadas oscilações sob a influência de inúmeros fatores. Êste fenômeno parece ocorrer também em *S. an.* Como será visto, após a supressão da respiração pulmonar, observou-se uniformidade bem maior nos valores para a troca de gases, de um modo geral sendo mais elevados os referentes aos animais mais pesados (cf. Tab. 2 e 3).

Analise-se, agora, os quocientes respiratórios obtidos em condições normais. Mínimo 0,329 e máximo 1,32. Ainda aqui se nota grande variação de valores entre indivíduos e num mesmo indivíduo. Todavia, como valores médios para cada animal, as cifras encontradas oscilam dentro de limites bem mais estreitos (máximo 0,821 e mínimo 0,597), predominando os valores entre 0,6 e 0,7. O predomínio de valores inferiores a 0,7 tido como de significação metabólica, requer uma consideração especial. Dontcheff e Kayser (1935), entre outros, estudando nos poiquiloter-

mos o significado dos Q.R. inferiores a 0,7, forneceram importantes dados sobre seu valor. Na Rã européa determinaram que é possível a obtenção de valores superiores, iguais ou inferiores a 0,7, segundo se equilibra o animal antes da experiência com uma atmosfera onde a concentração de CO<sub>2</sub> seja superior, igual ou inferior àquela reinante no fim da mesma. Já na Tartaruga não oscilou o Q.R. numa experiência em que a concentração final de CO<sub>2</sub> foi bem superior à inicial. Analisando as relações entre as concentrações iniciais de CO<sub>2</sub> e os Q.R. obtidos com *S. an.*, tirei a conclusão de que este Ginofiôno se comporta de certo modo como a Rã, visto que, de um modo geral, quando obtinha um Q.R. superior a 0,7, era o fato consequência de um maior acúmulo de CO<sub>2</sub> inicialmente dentro do aparelho. Como já foi referido, nas experiências, antes de introduzir o animal no tubo-câmara, por repetidas insuflações à custa da pêra era o meio aéreo interno renovado. Com isso iniciava-se a experiência oferecendo ao animal uma atmosfera onde a baixa concentração do CO<sub>2</sub> só tendia a aumentar, por se tratar de um método de confinamento. Este, pois, a meu ver, o fator preponderante que determinou o predomínio de Q.R. inferiores a 0,7 no decurso da medida da troca de gases de *S. an.* integros.

3. A sobrevivência de *S. an.* à supressão da respiração pulmonar prova nos Ápodos esta capacidade dos Anfíbios, há muito tempo conhecida nos Anuros e Urodelos. A resistência deste Ginofiôno à traqueoectomia parcial, por outro lado, demonstra a importância do integumento e, possivelmente, das mucosas bucoesofágica e traqueal na respiração.

A extirpação de um trecho da traquéa constitue por si só prova cabal do impedimento de acesso de ar aos pulmões, o que foi corroborado pela análise da troca de gases dos traqueoectomizados que demonstrou profunda alteração no processo respiratório. Do mesmo modo, o exame posteriormente realizado (dois meses após) do estado dos pulmões indicou a eficiência dessa técnica de eliminar, funcionalmente, estes últimos órgãos.

A resistência à supressão da respiração pulmonar tem sido considerada prova, embora indireta, da existência da respiração cutânea nos Anfíbios. É passível todavia da objeção de que, desde que a supressão seja conseguida por oclusão ou destruição das vias respiratórias a partir da laringe, não afeta a respiração que, possivelmente, se efetua pelas mucosas da bôca, faringe, esôfago e traquéia. Deste modo, a medida da troca de gases incluiria também a das referidas superfícies internas. A traqueoectomia parcial praticada em *S. an.* não impediu que o animal continuasse, ao voltar da anestesia, a aspirar pelas narinas o ar do exterior que, inutilmente tentava insuflar nos pulmões. Assim, não foi perturbada a renovação do meio aéreo da cavidade bucal, dos trechos craniais da traqueia e, provavelmente, do esôfago. Em *S. an.* (Mendes 1941, p. 293) estes dois últimos órgãos são irrigados am-

plamente com sangue oriundo das aa. pulmonares, tendo sido determinado no vivo o sentido da corrente sanguínea. Substância corada injetada no truncus, ligadas as raízes aórticas, vai ter a capilares subepiteliais do esôfago e da traquéa. Estes dados da morfologia e da observação tornam provável funcionarem o esôfago e a traqueia em *S. an.* como órgãos respiratórios acessórios. Desta maneira, a sobrevida dêste Ginofiôno à traqueoectomia parcial também poderia ser atribuída à respiração esofágica e à traqueal, cuja existência, todavia, carece ainda de prova experimental.

A modificação operada pela traqueoectomia parcial no consumo de oxigênio, eliminação de  $\text{CO}_2$  e quociente respiratório de *S. an.* foi bem pronunciada. Pela Tab. 2 verifica-se que a supressão funcional dos pulmões operou notável abaixamento na absorção do oxigênio. O maior consumo aqui registrado (0,725) é equivalente aos menores valores médios obtidos com os normais (cf. Tab. 1 e 4). De um modo geral, assemelham-se os valores máximos dos traqueoectomizados aos mínimos dos íntegros. A Tab. 4 confronta os valores médios das duas séries. É muito nítido o decréscimo no consumo, assumindo as diferenças para menos valores iguais ou claramente superiores aos registrados com os *S. an.* de respiração pulmonar abolida. Chama também a atenção nêstes serem as diferenças de consumo entre indivíduos ou num mesmo indivíduo muito menos amplas de que nos íntegros; é o que se pode deduzir dos desvios padrões de ambas as séries. Esta tendência à uniformização do consumo está de acôrdo com o que aludí à p. 40 sôbre estar a intensidade do funcionamento dos pulmões em *S. an.* como nos demais Anfíbios, condicionada a uma série de fatores muito maior que a da pele. Eliminados funcionalmente os pulmões, descontado o decréscimo de consumo motivado pela perda dêsses órgãos, o resultado foi a observação de valores mais uniformes para o consumo de  $\text{O}_2$ . O fato de, após a traqueoectomia, o consumo ter-se reduzido de metade ou até menos, poderá indicar que, em *S. an.*, como nos Anuros (Bohr, Krogh, etc. cit. seg. Winterstein 1921, p. 202), pelos pulmões sobretudo absorve-se o oxigênio, veiculando a pele, de preferência, o  $\text{CO}_2$ .

Vê-se pelas Tab. 1, 2 e 5 que, embora haja grande decréscimo na eliminação de  $\text{CO}_2$  pelos traqueoectomizados, as diferenças para menos são menos dilatadas que no caso do consumo de  $\text{O}_2$ . Só em dois casos ( $S_{26}$  e  $S_{27}$ ) assumem as diferenças grandes valores. Ressalta também da análise dos desvios padrões ter sido muito menor a flutuação, nos traqueoectomizados, dos valores para a eliminação observados entre indivíduos ou num mesmo indivíduo. Pode-se dizer, desta forma, que a supressão da respiração pulmonar redundou igualmente em tendência à regularização da eliminação de  $\text{CO}_2$ .

TABELA 4

Variações no consumo de oxigênio (% per hora) por *S. an.* como consequência da traqueoectomia

Animais	Consumo médio		Diferença	Desvio padrão	
	Íntegro	Traqueot.		Íntegro	Traqueot.
S <sub>24</sub>	0,665 (5) *	0,297 (6) *	—0,368	0,380	0,092
S <sub>25</sub>	0,746 (5)	0,337 (2)	—0,409	0,115	0,104
S <sub>26</sub>	1,045 (5)	0,319 (8)	—0,726	0,236	0,067
S <sub>27</sub>	0,780 (5)	0,326 (1)	—0,454	0,336	... ..
S <sub>28</sub>	0,937 (5)	0,332 (8)	—0,605	0,304	0,125
S <sub>30</sub>	0,856 (5)	0,381 (8)	—0,475	0,563	0,142
S <sub>31</sub>	0,714 (5)	0,395 (7)	—0,319	0,306	0,106
S <sub>32</sub>	0,725 (5)	0,281 (7)	—0,444	0,372	0,103

\* Número de determinações indicado entre parêntesis.

TABELA 5

Variações na eliminação de CO<sub>2</sub> (% per hora) por *S. an.* como consequência da traqueoectomia

Animais	Eliminação média		Diferença	Desvio padrão	
	Íntegro	Traqueot.		Íntegro	Traqueot.
S <sub>24</sub>	0,431 (5) *	0,244 (6) *	—0,187	0,205	0,015
S <sub>25</sub>	0,471 (5)	0,267 (2)	—0,204	0,093	0,086
S <sub>26</sub>	0,627 (5)	0,286 (8)	—0,341	0,170	0,043
S <sub>27</sub>	0,696 (5)	0,259 (1)	—0,437	0,293	... ..
S <sub>28</sub>	0,508 (5)	0,306 (8)	—0,202	0,103	0,086
S <sub>30</sub>	0,492 (5)	0,386 (8)	—0,106	0,177	0,101
S <sub>31</sub>	0,485 (5)	0,334 (7)	—0,151	0,117	0,072
S <sub>32</sub>	0,446 (5)	0,256 (7)	—0,190	0,144	0,050

\* Número de determinações indicado entre parêntesis.

TABELA 6

Variações do Q. R. de *S. an.* em consequência da traqueoectomia parcial

Animais	Q. R. médio		Diferença	Desvio padrão	
	Íntegro	Traqueot.		Íntegro	Traqueot.
S <sub>24</sub>	0.627(5) *	0.839(6) *	0.212	0.144	0.140
S <sub>25</sub>	0,633(5)	0.794(2)	0.161	0.095	0.03
S <sub>26</sub>	0.607(5)	0.919(8)	0.312	0.161	0.164
S <sub>27</sub>	0.644(5)	0.794(1)	0.150	0.114	.....
S <sub>28</sub>	0.597(5)	0.959(8)	0.362	0.190	0.254
S <sub>30</sub>	0.725(5)	1.056(8)	0.331	0.360	0.256
S <sub>31</sub>	0.704(5)	0.882(7)	0.178	0.130	0.218
S <sub>32</sub>	0.641(5)	0.978(7)	0.337	0.085	0.222

\* Entre parêntesis indica-se o número de determinações.

Como mostra a Tab. 2, assumiram os Q. R. da série dos traqueoectomizados valores acentuadamente maiores do que os dos íntegros: máximo 1,478 e mínimo 0,7. Os desvios padrões em ambas as series mais ou menos se equivalem (Tab. 6). Winterstein (1921, p. 201) afirma que os Q. R. elevados obtidos após o impedimento da respiração pulmonar, devem-se sobretudo à qualidade da pele de ser essencialmente veiculadora de CO<sub>2</sub>. Tal se afigura o caso presente.

4. A análise das Tabs. 1, 3 e 7 indica que os anestesiados, como os traqueoectomizados, passaram a consumir menos O<sub>2</sub>, apresentando aquela mesma tendência à uniformização. Na verdade, essa tendência é até mais acentuada, como pode ser apreciado do exame dos desvios padrões (Tab. 7). Em comparação com os traqueoectomizados, passaram os anestesiados a consumir geralmente mais oxigênio (Tab. 5 e 7). Talvez isso tenha acontecido em virtude da anestesia ter causado menos prejuízo às condições gerais dos animais do que a traqueoectomia.

Os números das Tab. 1, 3 e 8 revelam que os anestesiados eliminaram, em média, menos CO<sub>2</sub> que no estado normal, mas a eliminação é bem mais acentuada que a dos traqueoectomizados. Ainda neste caso, podem as melhores condições físicas dos anestesiados ser apontadas como causa do fenômeno. A uretana teria permitido que a pele manifestasse mais nitidamente seu papel na

TABELA 7

Variações no consumo de oxigênio (% per hora) por *S. an.* como consequência da anestesia

Animais	Consumo médio		Diferença	Desvio padrão	
	Íntegro	Anestes.		Íntegro	Anestes.
S <sub>41</sub>	1,047(5) *	0,511(4) *	—0,536	0,611	0,031
S <sub>42</sub>	0,857(5)	0,475(6)	—0,382	0,290	0,063
S <sub>43</sub>	0,939(5)	0,475(4)	—0,464	0,218	0,024
S <sub>44</sub>	0,761(5)	0,392(5)	—0,369	0,246	0,065
S <sub>45</sub>	0,730(5)	0,359(6)	—0,371	0,224	0,071

\* Número de determinações indicado entre parêntesis.

respiração, i. é, de veiculadora de CO<sub>2</sub>. Sobre a ação da uretana na respiração, apenas encontrei a informação de Wieland (1915, p. 117) de que a mesma na pomba opera um incremento da eliminação de CO<sub>2</sub>. Tratando-se, todavia, de um dado para um homeotermo de respiração exclusivamente pulmonar, é pouco provável que em Anfíbios a uretana atue semelhantemente, ainda mais sobre a respiração cutânea. Também, com relação à eliminação de CO<sub>2</sub>, mostraram os anestesiados, maior tendência à uniformização.

TABELA 8

Variações na eliminação de CO<sub>2</sub> (% per hora) por *S. an.* como consequência da anestesia

Animais	Eliminação média		Diferença	Desvio padrão	
	Íntegro	Anestes.		Íntegro	Anestes.
S <sub>41</sub>	0,656(5) *	0,530(4) *	—0,126	0,347	0,086
S <sub>42</sub>	0,582(5)	0,537(6)	—0,045	0,072	0,093
S <sub>43</sub>	0,652(5)	0,630(4)	—0,022	0,143	0,081
S <sub>44</sub>	0,527(5)	0,493(5)	—0,034	0,157	0,071
S <sub>45</sub>	0,611(5)	0,441(6)	—0,170	0,163	0,080

Número de determinações indicado entre parêntesis.

TABELA 9

Variações no Q. R. de *S. an.* como consequência da anestesia

Animais	Q. R. médio		Diferença	Desvio padrão	
	Íntegro	Anestes.		Íntegro	Anestes.
S <sub>41</sub>	0.657(5) *	1.237(4) *	0.580	0.073	0.195
S <sub>42</sub>	0.743(5)	1.126(6)	0.553	0.204	0.089
S <sub>43</sub>	0.702(5)	1.336(4)	0.634	0.068	0.236
S <sub>44</sub>	0.702(5)	1.281(5)	0.578	0.156	0.218
S <sub>45</sub>	0.821(5)	1.202(6)	0.381	0.088	0.262

\* Número de determinações indicado entre parêntesis.

Os valores médios para a troca de gases observada nas experiências dos animais traqueoctomizados ou anestesiados diminuem. Isso indica que, se é possível a sobrevivência dos *S. an.* após a supressão da respiração pulmonar, todavia, quando funcionando, possuem os pulmões papel sem dúvida importantes. Nem mesmo a hiperfunção da respiração cutânea que era de se esperar (Klug 184, p. 183) pela supressão da ventilação pulmonar, foi suficiente para contrabalançar a perda dos órgãos.

A eficiência da uretana, como eliminadora total dos movimentos gulares, foi previamente determinada por observações do tempo em que cessavam definitivamente aqueles movimentos. Esse tempo revelou-se ao redor de 3 horas. Depois desse período, os *S. an.* não mais moviam a região gular, nem mesmo na frequência de 1 movimento por hora. Goto (1934, p. 187) imergindo Salamandras em soluções de cloretona, conseguiu efeito semelhante. Instrutivo é confrontar os resultados desse autor com os aqui obtidos. Observou êle, também, nos narcotizados, um abaixamento no consumo de O<sub>2</sub> e na eliminação de CO<sub>2</sub>. Todavia, os Q. R. referentes à série narcotizada são inferiores aos normais, o que não sucede com o *S. an.* A meu vêr, deve-se êsse resultado discordante obtido por Goto, a uma imprecisão experimental, pois, o consumo de O<sub>2</sub> nas Salamandras narcotizadas continuou, contrariamente ao que se dá nos Anfíbios, a ser mais elevado do que a eliminação de CO<sub>2</sub>. Talvez o modo de anestésiar os animais tenha preponderantemente influido no funcionamento da pele como órgão respiratório, prejudicando o seu papel de veiculadora de CO<sub>2</sub> por excelência.

No caso de *S. an.* a anestesia por injeção intraperitoneal teria causado menos dano à troca de gases pelo integumento. A circulação, visível através dêste último, foi mantida.

Os Q. R. dos anestesiados (Tab. 3 e 9) são muito mais elevados do que no estado normal e mesmo superiores aos dos traqueotomizados (Tab. 6). Geralmente (Tab. 3), assumiram valores elevados (mínimo igual a 0,946 e máximo 1,686). Nas experiências de Dolk e Postma (1927, p. 437), produziram-se no "sistema cutâneo" Q. R. superiores (máximo: 2,15) até aos verificados com os *S. an.* anestesiados, de modo que o máximo obtido nesta série não é tão alto.

b) Mecanismo do enchimento dos pulmões e oscilações gulares.

#### *Observações e experiências:*

1. Como na Rã européa, pode-se, em *S. an.*, dizer com Bábak (1921, p. 718) que "O típico ato respiratório pulmonar fundamenta-se numa grande série de movimentos que se realizam de um lado, concomitantemente e, de outro, numa sequência determinada nos diferentes trechos da via respiratória".

Naquêl Anuro êsse processo foi exaustivamente estudado, como se viu à p. 29 entre outros, por Gaupp (1896, p. 200). Três fases distintas são aí perceptíveis. Numa primeira, estando ocluidas anteriormente a boca e posteriormente a faringe, por movimentos de abaixamento do assoalho da boca e conseqüente aumento da cavidade desta, é o ar aspirado do exterior através dos dutos nasais (aspiração). Quase ao findar essa fase, abre-se a fenda laringea e o ar aí mantido sob pressão corre dos pulmões à cavidade bucal, o que contribue, agora passivamente, para um maior abaixamento do assoalho da mesma. Sobrevem, então, a segunda fase, na qual se observa diminuição da cavidade bucal em virtude de um rápido levantamento do assoalho. Mecanismo especial oclue então a entrada das coânas, impedindo a evasão do ar. Concomitantemente, abre-se ainda mais a fenda laringea e o ar é premido para os pulmões (inspiração). Reiniciam-se então os movimentos oscilatórios gulares ("*Kehloscillationen*"), mantendo-se a fenda laringea fechada e abertos os dutos nasais. Na terceira fase (expiração), talvez desempenhe a elasticidade dos pulmões um papel importante. Igualmente contribue a pressão intra-abdominal, pois, os pulmões cheios premem as vísceras, deslocando-as. Estas tendem a voltar à posição primitiva, originando-se daí a referida pressão. A abertura da fenda laringea, que durante o tempo das oscilações gulares permanece fechada, dá-se por atividade muscular especial. Na verdade, durante a aspiração, a laringe é repuxada fortemente para trás, depois move-se para diante simultaneamente com a abertura da fenda laringea, seguindo-se finalmente um retrocesso à posição primitiva, o que redundo no fechamento da rima referida.

Nos Urodelos e nos Apodos, como foi indicado no capítulo 2, p. 29, tudo se processa de modo semelhante. Quanto aos últimos, Marcus (1923), baseado em trabalho anterior (cf. l. c.) e no de Gehwolf (1923), ambos morfológicos, formulou uma série de considerações acêrca do mecanismo de enchimento dos pulmões no *Hypogeophis*, não lhe tendo sido possível observar animais vivos. Para Marcus (l. c.), também em *Hypogeophis* se observam as 3 fases mencionadas acima. Poderosa musculatura pode afastar ou aproximar os arcos branquiais. Quando êstes se aproximam, todo

o aparelho hio-branquial, como consequência, se levanta e, com êle, o assoalho da boca e a laringe. Dêste modo, pode a cavidade bucal de *Hypogeophis* ser aumentada ou diminuída, esclarecendo-se assim a aspiração e a inspiração. Nesta última, como foi acenado à p. 30, dá-se o fechamento dos dutos nasais por meio de duas pregas localizadas nas coanas, impedindo-se, pois, o refluxo do ar aspirado para o exterior. A passagem do ar para os pulmões está naturalmente condicionada à abertura da laringe. Esta é suspensa a uma presilha óssea transversal, imediatamente situada sob o epitélio do esôfago. Ao ser repuxada para cima e para diante, abre-se durante a inspiração a fenda laringea e, assim, torna-se ela a única das 4 aberturas da cavidade bucal através da qual o ar comprimido pode escoar-se, porquanto a boca está também fechada. Resta, porém, explicar a oclusão do esôfago. Marcus demonstrou um curioso mecanismo oclutor do ádito esofágico durante a inspiração. A mencionada presilha óssea transversal à que está suspensa a laringe, quando esta é repuxada para cima e para frente, preme contra a luz do esôfago, operando a aproximação da parede ventral à parede dorsal do referido órgão. Musculatura especial intervem no deslocamento da presilha. O fechamento da laringe durante a pausa respiratória que sucede à inspiração, é proporcionado por um esfíncter situado à entrada desta, o qual se relaxa na expiração ativamente e sob a pressão da elasticidade da laringe. Um músculo dilatador intervem igualmente na abertura da rima laringea. O esvaziamento dos pulmões se processa principalmente pelo tecido elástico, possivelmente também influenciando uma pressão intra-abdominal, como no caso da Rã. Pagenstecher (cf. Marcus 1923, p. 339) admitiu que as compridas e bem desenvolvidas costelas, em sua movimentação, favoreceriam a inspiração, fato contra o qual se insurge decididamente Marcus.

2. Sendo os *S. an.* animais excitáveis ao tacto e de fototactismo negativo, não é fácil colocá-los em posição propícia à observação dos movimentos respiratórios que seja, ao mesmo tempo, próxima da natural. Utilizei-me de dois métodos. No primeiro, depusitei-os em cápsulas de vidro, enchendo-as em seguida com terra. Os animais mantiveram-se no fundo com a região ventral acolada à superfície de vidro. Levantando tais dispositivos de modo a poder observá-los por debaixo, foi possível verificar os movimentos da região gular por tempo suficiente. Noutra ocasião, envolvi completamente os *S. an.* em panos umedecidos. Ao cabo de algum tempo, desembaraçavam a região anterior das dobras do pano, e, com a cabeça de fóra, colocavam-se em posição favorável à observação. Esse último método, todavia, era de emprego menos duradouro, pois os animais freqüentemente se recolhiam, dado o fototactismo negativo.

Como pude observar, as oscilações gulares são constantemente executadas pelos animais e apenas cedem lugar, de quando em quando, a movimentos incomparavelmente mais acentuados da região respectiva, os quais são os que propriamente se destinam ao enchimento dos pulmões (movimentos inspiratórios). Cessados êstes últimos, sem intervalo perceptível, reiniciam-se as oscilações gulares.

No animal anestesiado, ainda que ligeira a anestesia, cessam os movimentos gulares. Sòmente se os *S. an.* forem excitados (picada de agulha, éter sôbre a pele) é que, nessas leves aneste-

sias, se reiniciam os referidos movimentos respiratórios. Normalmente, porém, os movimentos inspiratórios em média, se intercalam de 1,5-2 minutos entre as oscilações gulares, numa frequência média de 18 movimentos. Na seguinte Tab. 10, foi registrada a alternância de oscilações gulares com os movimentos inspiratórios.

TABELA 10

Verificação da frequência dos movimentos inspiratórios e do modo por que se intercalam entre as oscilações gulares. (Animal S<sub>56</sub>)

Tempo (mins.)	Tipo de movimento verificado
0- 1	<i>oscilações gulares</i>
1- 2	” ”
2- 3	” ”
3- 4	” ”
4- 5	” ”
5- 6	18 movimentos inspiratórios a partir do 30º seg.
6- 7	<i>oscilações gulares</i>
7- 8	” ”
8- 9	18 movimentos inspiratórios a partir do 1º seg.
9-10	18 movimentos inspiratórios a partir do 40º seg.
10-11	<i>oscilações gulares</i>
11-12	19 movimentos inspiratórios a partir do 30º seg.
12-13	<i>oscilações gulares</i>
13-14	18 movimentos inspiratórios a partir do 30º seg.
14-15	19 movimentos inspiratórios a partir do 30º seg.
15-16	<i>oscilações gulares</i>
16-17	18 movimentos inspiratórios a partir do 20º seg.
17-18	<i>oscilações gulares</i>
18-19	” ”
19-20	17 movimentos inspiratórios a partir do 1º seg.

3. Afim de estudar o mecanismo do enchimento dos pulmões, submeti vários *S. an.* à anestesia pouco profunda.

Colocados sobre a prancheta em decúbito dorsal, incisei a linha mediana ventral de um ponto ao nível do extremo posterior do fígado até o situado na altura da origem externa das aa. pulmonares e raízes aórticas. Rebatidas lateralmente as paredes do corpo e fixadas sobre a prancheta, foram expostos em toda sua extensão ambos os pulmões. Todos os órgãos à vista foram umedecidos constantemente com Ringer para Anfíbios. Como foi há pouco mencionado, os *S. an.*, mesmo em condições de leve anestesia, deixam de movimentar a região gular, o que só fazem se for a mesma excitada. Deste modo, afim de observar a influência dos dois tipos de movimentos gulares (oscilações e movimentos inspiratórios), sobre o enchimento dos pulmões, foi necessário excitar os animais na referida região com uma agulha.

Nestas condições, verifiquei que as oscilações gulares não tiveram a mínima repercussão sobre os pulmões, que continuaram murchos como nas condições iniciais da observação. Sobrevie-

ram, então, os movimentos inspiratórios. A cada um destes adquiriam, agora, os pulmões um grau cada vez maior de enchimento, até um máximo, caracterizado pela elevação da ponta do pulmão direito, que é livre. Cessavam, então, os movimentos inspiratórios, reiniciando-se, por sua vez, as oscilações gulares. Nessa pausa respiratória, mantiveram-se os pulmões permanentemente cheios, durante um certo tempo. Subitamente, esvaziavam-se e decorria de novo certo período para que, com novos movimentos inspiratórios, tornassem a se encher. Deve-se observar que, nas condições operadas, foi eliminada na expiração a pressão intrabdômica, que, provavelmente em *S. an.*, deve igualmente contribuir para o esvaziamento dos pulmões. Não obstante essa e outras circunstâncias desfavoráveis (por ex., anestesia do animal, exposição dos pulmões), as observações aqui realizadas, se não esclarecem na totalidade o mecanismo de enchimento dos pulmões de *S. an.*, pelo menos dão certas indicações interessantes, como a verificação de que as oscilações gulares não servem para o enchimento, o qual se processa apenas em virtude dos movimentos inspiratórios.

Não se percebem em *S. an.* intátos, externamente, sinais do enchimento dos pulmões, tais como o abobadamento dos flancos durante a inspiração e volta à posição primitiva na expiração, como se dá com os Anuros.

4. Quanto à ventilação pulmonar, em sua maioria, os fatos estabelecidos por Marcus (1923) sobre o mecanismo respiratório em *Hypogeophis* se aplicam ao *S. an.*, revelando notar que neste último Ginofiôno, ao lado da pesquisa morfológica, foram juntadas a observação e a experimentação. Pequenas diferenças de pormenores da estrutura são, no entanto, de se observar entre ambos os Apódos, as quais, porém, não vêm alterar os fatos fundamentais do mecanismo respiratório.

Em *S. an.*, as coânas (Fig. 2, c) situam-se anteriormente, sendo seus bordos ósseos constituídos inteiramente pelo palatino (Wiedersheim 1879, p. 13). O mecanismo do fechamento das coânas faz-se em *S. an.*, também por uma válvula mucosa, que é no entanto, única (Fig. 3, v). Tal válvula foi bem evidenciada numa série de cortes sagitais e transversais e na figura está representada num corte paramediano sagital. Dada sua disposição, esta válvula permite a aspiração do ar exterior, mas, quando se eleva o assoalho da boca na inspiração, preme contra os bordos internos da coâna, impedindo o refluxo. Digno de nota é o fato de o epitélio que reveste a prega, diferir nitidamente do que lhe é contíguo. Na região da prega não se notam cílios, mas queratinização. Outro pormenor revelado pela Fig. 3 e que diz respeito agora à obturação da boca durante a inspiração e, também, a aspiração é o referente à ponta da língua (l) que, como mostra a figura, tem tal configuração que se ajusta perfeitamente ao teto da cavidade bucal. Para certificar-me da eficiência da válvula descrita, procurei experimentalmente demonstrar sua capacidade em obturar a coâna durante os movimentos de levantamento do assoalho da cavidade bucal. Com êsse fim, em animal recém-sacrificado foi a mandíbula removida e a cabeça imersa em Ringer. Com auxílio de uma cânula de vidro de ponta bem fina, foi possível a in-

sufilação de ar através das narinas, de que resultou a produção de borbulhas no líquido. Operada a insuflação em sentido retrógrado, i. é, cânula introduzida na coâna, o ar não saiu pelas narinas.

A rima laríngea (Fig. 1, r. l.), está envolvida, em *S. an.*, pelo último arco branquial, medianamente situada, logo abaixo do ponto de junção das duas peças que compõem o arco. No animal morto, quando o assoalho da boca está em posição intermédia entre aspiração e inspiração, apresenta-se ela semi-aberta. Para a elucidação do mecanismo de abertura e fechamento da laringe nas várias fases do processo respiratório, tornou-se necessária a confecção de preparados histológicos transversais e longitudinais ao nível de sua região. A análise das preparações microscópicas proporcionou-me elementos para esclarecer o mecanismo de abertura e fechamento da glote. No corte transversal das Figs. 6 e 7, o esôfago (e) situa-se sôbre os dois processos laterais do último arco branquial (a) e a laringe (l). O epitélio desta última é ladeado pelas cartilagens laterais (c). Superiormente nota-se um músculo (s), cujas fibras se dispõem aneladamente, envolvendo quasi por inteiro a laringe e, mais ventralmente, as próprias cartilagens laterais. No seu aspecto, mostra ser um típico esfíncter. Entre êste músculo e os processos laterais do último arco branquial (a), de cada lado, localiza-se dorsalmente um outro que, seguido através dos cortes seriados, revela originarse (Fig. 7, d), na extremidade caudal dos referidos processos e inserir-se nas partes aritenas das cartilagens laterais. Pelo seu encurtamento, repuxa lateralmente essas cartilagens, operando a abertura da rima laríngea. Finalmente, em posição ventro-lateral, limitando com fibras do ocluser, encontra-se um músculo (Fig. 7, v) repuxador da laringe.

Procurei, pela dissecação, certificar-me da topografia dos músculos mencionados e a sua função no intuito de comprovar os dados obtidos da análise microscópica. Na Fig. 4, que mostra a vista dorsal da laringe após a remoção da mucosa, estão representadas as relações entre a rima laríngea e a musculatura constrictora e dilatadora do órgão, a saber, o musculus laryngeus dorsalis (d), e o sphincter aditus laryngis (s). O esfíncter contorna a porção caudal das cartilagens laterais. Toma sua origem ventralmente numa linha mediana, como pode ser observado na Fig. 5 (s). Suas fibras, ao contornarem o ducto laríngeo, espalham-se em leque caudal e cranialmente, reunindo-se na linha mediana dorsal, caudalmente à rima laríngea. O m. laríngeo dorsal origina-se ventralmente (Fig. 5, d) nas extremidades laterais do último arco branquial (a) e dirige-se no sentido cranial, em percurso nitidamente oblíquo, indo inserir-se dorsalmente na porção anterior dos flancos das cartilagens laterais. A vista ventral da Fig. 5 foi obtida após rebatimento dos mm. thoraxico-hyoidei para os lados. Mostra ela um músculo (v) que, como o laríngeo dorsal, se origina da face ventral das extremidades dilatadas do último arco branquial. Fá-lo, porém, mais internamente, dirigindo-se cranialmente em percurso quasi horizontal, indo inserir-se próximo à linha mediana ventral das cartilagens laterais, mais cranialmente que o laríngeo dorsal. Ao passo que êste último (d), pela sua posição, está em condições de operar a abertura da laringe, sendo, pois, um antagonista do esfíncter, o outro (v) é nitidamente um repuxador do órgão. Pode, assim, ser assemelhado com o descrito por Gehwolf (1923, p. 446), de *Hypogeophis*, como musculus brachioparytaenoideus = m. retractor laryngis. Este autor, descrevendo embriões ou formas muito jovens, assinalou ainda em *Hypogeophis* a ocorrência de um outro dilatador, o musculus laryngeus ventralis, o qual não pode ser consignado em *S. an.*, pelo menos no estado adulto. Esta ressalva é muito importante, porquanto é sabido (Wilder 1896; Drüner 1902) que, com freqüência, se altera profundamente a musculatura na passagem ao estado adulto. Assim, por exemplo, Drüner (l. c. p. 531), em *Salamandra*, menciona que a musculatura da laringe nessa fase de vida é muito reduzida, sendo apenas o m. constrictor aditus laryngis, equivalente ao esfíncter presente, o músculo que ocorre em regra em posição e forma correspondentes às da vida larval. Dos mus-

culi laryngei dorsalis et ventralis, apenas ficam vestígios. Somente um confronto com fases muito jovens poderá esclarecer, em *S. an.*, o destino possível do m. laringeo ventral, bem como ratificar ou negar as denominações aqui aplicadas ao dilatador e ao repuxador da laringe, feitas em analogia ao quanto foi descrito por Gehwolf em *Hypogeophis*.

5. *Mecanismo oclisor do esôfago.* Como ressalta do exame das figuras 6 e 7, não se encontra em *S. an.*, entre o duto laríngeo e o esôfago, aquela presilha óssea transversal (*Knochenquerspange*) que, segundo Gehwolf (1923, p. 437, 448 e 452) e Marcus (1923, p. 336 e 337), em *Hypogeophis*, impede na inspiração a entrada de ar no esôfago. A ausência dessa formação em *S. an.*, de um lado está de acordo com as observações por mim realizadas em trabalho anterior (1941), segundo as quais o esôfago teria função respiratória, porquanto é provido de capilares intraepiteliais oriundos das aa. pulmonares. Procurei, não obstante, verificar se, em substituição à referida presilha óssea, ocorria uma outra formação ou dispositivo especial que, durante a inspiração, operasse a oclusão do esôfago. Nada, porém, me pareceu eficazmente apto para a realização de tal função. Quando muito as extremidades posteriores do último arco branquial que, como já observou Wiedersheim (1879, p. 33), são "muito fortemente dilatada, poderiam, no movimento de ascensão do assoalho da boca, obturar a entrada do esôfago. As superfícies de tais extremidades são suficientemente grandes para atuarem com eficiência nêsse sentido.

6. *Fases da ventilação pulmonar.* Elucidadas a obturação das fossas nasais e a projeção, com conseqüente abertura, da rima da laringe para diante, durante o levantamento do assoalho da boca; explicada a função dos músculos laríngeos e, finalmente, pesquisada a possibilidade de oclusão do esôfago durante a inspiração, poder-se-á agora entender como se processa em *S. an.* a ventilação pulmonar.

Seguindo-se à pausa respiratória, quando a entrada da laringe está impedida pela contração do esfíncter, os pulmões estão cheios de ar e o assoalho da boca executa as oscilações gulares, inicia-se a expiração. O animal, por um mais acentuado levantamento do assoalho bucal, opera o relaxamento do esfíncter e os pulmões esvaziam o seu conteúdo, sob a ação da própria elasticidade e, possivelmente, de uma pressão intra-abdominal. Sobrevem, então, o abaixamento até posição média do assoalho bucal e reinício das oscilações gulares por um certo tempo. Novamente executa o animal repetidos e acentuados levantamentos e abaixamentos do assoalho, pelo que o ar é sucessivamente aspirado do exterior (fase que corresponde ao abaixamento, quando se acha ocluída a rima laríngea) e inspirado para os pulmões (fase que corresponde ao levantamento, quando se abre a rima, impossibilitando a válvula da coana o refluxo para o exterior), que se

enchem gradualmente. Ocorre então uma nova pausa respiratória com as características oscilações gulares.

7. *Registro gráfico da ventilação pulmonar.* Como complemento final ao estudo do mecanismo de enchimento dos pulmões em *S. an.*, procurei efetuar o registro gráfico dêste fenômeno. Não houve, todavia, aqui, possibilidade de emprêgo dum método que dispensasse a anestesia do animal, o que veio prejudicar um tanto o registro.

Coloquei a ponta caudal do pulmão direito em ligação com diminuta cápsula de Marey e prendí, por um fio, a pele da região gular à alavanca de um quimógrafo. Por especial disposição do conjunto, foi possível o registro concomitante dos movimentos da referida região com o enchimento gradual dos pulmões. Dada a anestesia a que se submeteram os animais experimentados, tornou-se aqui igualmente necessário estimular mecanicamente a região gular, afim de que se puzessem a executar oscilações gulares e movimentos inspiratórios. Como, porém, a anestesia foi pouco profunda, às vezes os animais, espontaneamente, executaram movimentos respiratórios.

O gráfico da fig. 9 é elucidativo de como as oscilações gulares se executam permanentemente entre duas séries de movimentos inspiratórios e, também, da concordância dêstes últimos com o enchimento gradual dos pulmões. Infelizmente, porém, a cápsula de Marey empregada no caso foi de grandes dimensões, de modo que o registro do enchimento dos pulmões foi prejudicado por não ter o ar insuflado no pulmão pressão suficiente para mover a alavanca. Todavia, no caso do gráfico da fig. 10, onde foi usada uma cápsula menor (2 cm diam.) é nítida a coincidência dos movimentos inspiratórios, e do enchimento gradual do pulmão. Vê-se também que as oscilações gulares não contribuem para êsse enchimento, o que, aliás, também se deduz do gráfico da fig. 9. No gráfico da fig. 10 notam-se inicialmente as pequenas oscilações gulares, que são sucedidas por movimentos mais acentuados de enchimento do pulmão. Sòmente não foi possível o registro da pausa respiratória com o pulmão cheio. Tal é de se atribuir às condições em parte artificiais da experiência. Bem significativo, por outro lado, é o registro nos gráficos de um número médio de movimentos inspiratórios, aproximado ao obtido na contagem dos mesmos quando da observação do animal em posição de repouso. Em ambos os gráficos, isso é observado. No da fig. 9 podem-se contar nitidamente 18 movimentos e no da fig. 10, sucessivamente, 19, 20 e 21.

*Conclusões* — A análise do mecanismo de ventilação pulmonar em *S. an.* foi realizada com base em dados morfológicos aliados à observação e à experimentação.

Contornada a dificuldade de colocar os *S. an.* em posição favorável à visão dos movimentos do assoalho da boca, pude ava-

liar externamente as particularidades e o ritmo do referido mecanismo. Em *S. an.* as oscilações gulares são muito nítidas e contínuas entre duas séries de movimentos inspiratórios. Tais oscilações, como ficou demonstrado, não servem para o enchimento dos pulmões. Talvez se relacionem com uma respiração bucofaringea, pois em Anuros e Urodelos, com base na sua existência, tem-se pretendido funcionar a mucosa da boca e da faringe como órgãos respiratórios. *S. an.*, com uma média de 200 oscilações gulares por minuto, coloca-se entre *Spelerpes* (189) e *Salaman-drina perspicillata* (300) (Winterstein 1921, p. 214), ambos esses Urodelos apulmonados, nos quais se atribue realmente papel respiratório às mucosas referidas. A elucidação do problema em *S. an.* demandaria um cuidado especial, fóra dos propósitos deste trabalho. Fica, por isso, aqui apenas acenada a questão.

Não conseguí registrar graficamente o possível enchimento do esôfago durante a inspiração (gráfico da fig. 10). A análise das preparações microscópicas não revelou, no entanto, quaisquer órgãos indubitavelmente capazes de ocluir o esôfago durante essa fase do processo respiratório pulmonar. Possivelmente, como assinalei, as extremidades posteriores do último arco branquial possam contribuir nêsse sentido.

No que se refere aos fatos fundamentais do processo da tomada e envio de ar aos pulmões, preocupei-me nêste trabalho sobretudo com dois pontos: a oclusão das coânas e a abertura da rima laríngea. Não foi tomada em consideração a atividade muscular que opera o levantamento e abaixamento do assoalho da boca.

Considero dêste modo, em parte, esclarecido o mecanismo respiratório pulmonar de *S. an.* Estudos posteriores poderão dirimir certas dúvidas ainda existentes e, além disso, pôr à prova o mecanismo de levantamento e abaixamento do assoalho bucal. Êste, de resto, não deve ser muito diferente do que ocorre em *Hypogeophis*, o qual, por sua vez, pode ser assemelhado ao dos demais Anfíbios.

### c) Mecanismo da circulação intracardiaca em *Siphonops annulatus*.

Morfologicamente, o coração de *S. an.* apresenta algumas peculiaridades, das quais menciono um sêio venoso sinistro descoberto por Sawaya (1940, p. 228), e a comunicação entre os átrios (Wiedersheim 1879, p. 78; Sawaya 1940, p. 231 e 1941, p. 216) como já foi referido. Este último carater é de importância fisiológica, porquanto além de ser livre o bordo do septo endatrial ao nível da porção mediana, sua parede é provida de inúmeros orifícios que dão passagem ao sangue de um para outro átrio. No truncus falta, como foi apontado, a prega espiral. Como se vê, torna-se obvio que nenhuma estrutura existe no coração de *S. an.* que possa ser responsável por uma separação do sangue venoso

do arterial. À vista disso, procurei verificar experimentalmente, pelo emprêgo da técnica de Vandervael (1933) em *Rana*, se de fato, no coração do *S. an.*, o sangue chegado ao átrio esquerdo se mistura já aí com o do átrio direito e se a massa sanguínea que do ventrículo passa ao truncus é ou não igualmente distribuída pelas raízes aórticas e aa. pulmonares.

Antes do trabalho do autor belga mencionado, admitiu-se geralmente que, na circulação intracardiaca dos Anfíbios, especialmente nos Anuros, sangue venoso do átrio direito e sangue arterial do esquerdo chegassem alternadamente ao ventrículo. A contração dêste último, iniciando-se da direita para a esquerda, impeliria primeiramente o sangue venoso e depois o arterial para o truncus. Nêste, como foi referido à p. 31, a prega espiral se encarregaria de dirigir as duas qualidades de sangue para o destino respectivo. Tal o fundamento, como se viu, da teoria de Brücke-Sabatier. Inúmeras tem sido as críticas a essa concepção do mecanismo da circulação cardíaca que foi, sobretudo, proposta para a Rã. Entre nós, favorável a ela manifestou-se Ozorio de Almeida (1923, p. 1019). Em *Leptodactylus ocellatus*, fazendo insuflações rítmicas dos pulmões, observou que "o ventrículo se apresenta a cada diástole dividido em duas partes: a direita continua negra e a esquerda se mostra com a cor vermelha do sangue oxigenado". Essas partes são completamente separadas por uma linha nítida, não se misturando as duas ondas. Tem-se a impressão, diz o autor, que há dois ventrículos separados por um septo. Todavia, Vandervael (l. c.), procurando em *Rana temporaria* e *Rana esculenta*, por técnica nova, mais uma vez a confirmação da teoria de Brücke, concluiu ao cabo de suas pesquisas, pela negativa, porquanto nada observou ou experimentou indicativo de uma separação, a partir do ventrículo, dos sangues oriundos dos dois átrios. Além disso, pôs em relevo um fato já ressaltado por vários autores alemães de que o sangue do átrio direito não pode ser tido somente como venoso, porquanto contém todo aquêle que foi arterializado ao nível do integumento, órgão por excelência respiratório nos Anfíbios. A própria válvula espiral, diz o autor, não serve como mecanismo selecionador. Em ambas as fases da sístole ventricular não conseguiu distinguir mudança de posição da referida válvula que tendesse a enviar ora o sangue para uma rampa ora para outra. A válvula, a cada jacto de sangue proveniente do ventrículo, manteve-se rigorosamente paralela à parede do truncus, enviando às aortas ou aos troncos pulmo-cutâneos a mesma qualidade de sangue. Aliás, como observa, ainda que funcionasse como se tem pretendido, enviaria à rampa pulmo-cutânea sangue mixto e não venoso, vindo do átrio direito.

Vandervael utilizou-se preferencialmente de dois métodos: a) transiluminação das várias partes do coração por meio de uma lâmpada oftalmoscópica; b) injeção de pequenas quantidades de uma solução de Ringer-nankin nos vasos que levam ao coração, observando, a seguir, o percurso dessa solução dentro do órgão.

Dada a existência, em *S. an.*, de átrios comunicantes, essa verificação, como disse, por si só bastaria para levar à conclusão de que o sangue que vem ter ao ventrículo já é misturado. Além disso, carece o truncus de válvulas ou pregas tendentes a dar ao sangue uma determinada direção. Não obstante, achei interessante verificar se, pelos métodos de Vandervael, chegaria a justificar a opinião decalcada dos resultados de Sawaya (1940) de que o coração de *S. an.* é um órgão meramente propulsor do sangue.

#### *Experiências:*

*S. an.* selecionados entre os de maiores dimensões foram anestesiados e operados de modo a expor o coração e os órgãos circunjacentes, os quais foram constantemente banhados com Ringer. Com o auxílio de uma lâm-

pada oftalmoscópica introduzida entre a face dorsal cardíaca e a coluna vertebral, pode observar o seguinte:

1. A cada sistole ventricular enchem-se, ao mesmo tempo, as raízes aórticas e as aa. pulmonares, que, pelo regorgitamento, chegam a mudar de posição. As raízes aórticas deixam de ser paralelas, tornando-se convexas para os lados. As aa. pulmonares elevam suas crossas rostralmente, re-puxando para os lados a porção que se dirige aos pulmões. Neste trecho das artérias pulmonares nota-se nítida ondulação à passagem do fluxo sanguíneo. Igualmente se distendem todos os grandes ramos oriundos das aa. pulmonares que se dirigem ao esôfago e à traqueia.

2. Átrio direito e átrio esquerdo pulsam simultaneamente, sucedendo à pulsação dos seios após curtíssimo intervalo. Esse sincronismo de batimentos dos átrios pôde ser observado com maior facilidade quando afastado convenientemente o truncus para o lado esquerdo.

3. Nenhuma diferença de coloração foi notada entre as duas metades do ventrículo. Essa verificação é válida, seja para o caso do animal cuja ventilação pulmonar foi suprimida pelo anestésico, seja para o em que, dada a anestesia pouco profunda, os pulmões se enchiam e se esvaziavam em ritmo quase normal durante a observação. Também os átrios não se mostraram diferentemente corados durante qualquer das fases do seu ritmo. Com auxílio da lâmpada oftalmoscópica, pude com segurança notar que, no interior do truncus, não se distinguem pela cor duas correntes de sangue aí progredindo. Finalmente, são da mesma cor aa. pulmonares e raízes aórticas.

4. O truncus é percorrido por uma só onda sanguínea. O sangue premido pela sistole ventricular, penetra no conus, de onde é impedido de refluir pela válvula sigmóide descrita por Sawaya (1940, p. 236-237) como válvula ventral, situada no orifício de passagem cono-ventricular. Sobre-vem, então, a sistole do conus que impele o sangue para o truncus; duas válvulas sigmóides do orifício de passagem impedem o refluxo. Contraindo-se, finalmente, o truncus, o sangue penetra ao mesmo tempo nas aa. pulmonares e raízes aórticas. À pressão da onda sanguínea, cede o bordo ventral do orifício inicial da a. pulmonar direita de tal sorte que executa um movimento perfeitamente visível quando a lâmpada oftalmoscópica é colocada por baixo da origem da referida artéria. Transiluminado o truncus, ao nível de sua aparente quadrifurcação externa, pode-se mais uma vez observar que os 4 vasos são percorridos por ondas síncronas. O tamanho relativamente grande das hemácias de *S. an.* constitue ótimo ponto de reparo para a identificação da corrente sanguínea.

5. Pinçada firmemente a v. pulmonar impar, logo após sua origem, diminue de modo considerável a quantidade de sangue que aflue ao átrio esquerdo, que se torna um tanto esbranquiçado, denotando aí chegar sangue também por outra via. Isso se confirma quando se obstrue a v. jugular sinistra; o átrio esquerdo empalidece visivelmente.

6. Impedindo-se a v. cava posterior, a v. jugular dextra e a v. renal de lançarem sangue no seio principal e, ao mesmo tempo, pinçando a v. jugular sinistra, torna-se muito pálido o coração. Como nesta manobra fica apenas livre a v. pulmonar impar, no truncus, a cada sistole, eleva-se uma débil coluna sanguínea que, não obstante, continua a penetrar pelas cavidades à disposição.

7. Solução de Ringer-nankin foi injetada na v. pulmonar dextra, um pouco antes de sua confluência com a sinistra. A cada leve pressão do êmbolo da seringa, uma pequena quantidade de solução negra caiu na circulação, sendo levada sucessivamente à veia pulmonar impar, ao átrio esquerdo, ao átrio direito, ao ventrículo, ao truncus e dêste distribuída tanto às raízes aórticas como às aa. pulmonares.

8. A mesma solução injetada no vaso esquerdo do segundo par apical das veias hepáticas foi levada pela cava inferior aos seios, átrios, ventrículo, truncus e dêste, como no caso anterior, distribuiu-se tanto às aa. pulmonares como às raízes aórticas.

**Discussão:** De todas essas observações e experimentações, pode-se deduzir que o coração de *S. an.*, como o de muitos Urodelos é um órgão em que, dada a ausência de um completo septo endatrial, se misturam os sangues. que veem ter aos dois átrios, conforme sugeriam os pormenores morfológicos.

Vandervael (1933) analisou qualitativa e quantitativamente as massas de sangue que chegam aos dois átrios de *Rana temporaria* e *R. esculenta*. Ao direito chega uma quantidade de sangue incomparavelmente maior e misturado, como foi mencionado à p. 55, ao passo que ao esquerdo chega sangue puramente arterial. Dada a ineficiência da válvula espiral, uma mesma qualidade de sangue é impelida para a rampa aórtica e a pulmo-cutânea. Em *S. an.*, a quantidade de sangue que a veia pulmonar ímpar, um vaso de dimensões exíguas, traz ao átrio esquerdo é bem menor ainda, relativamente à que chega ao átrio direito. O sangue que sae do coração pelas aa. pulmonares, além disso, distribue-se em grande parte pelo esôfago e traqueia (Mendes 1941). Por outro lado, dada a existência de uma respiração cutânea em *S. an.*, o sangue arterializado ao nível do integumento deve regressar ao átrio direito, o que torna o sangue dessa cavidade misturado. Dada a inexistência de completa septação endatrial, o sangue do ventrículo é sem dúvida mais misturado ainda. Seria inútil, desta maneira, a existência no truncus de um mecanismo separador de duas qualidades de sangue.

O emprêgo do método de Vandervael permitiu-me determinar experimentalmente aquilo que considerações baseadas em dados morfológicos levavam a admitir. A simultaneidade de enchimento e pulsação, a identidade de coloração dos átrios e a igualdade das duas metades do ventrículo quanto à côr confirmam ser de uma só qualidade o sangue que atravessa o coração. Mesmo mantida a insuflação de ar nos pulmões, não se distinguiram duas metades no ventrículo quanto à côr. As experiências de injeção de solução de Ringer-nankin mostraram, também, a mistura dos sangues dos dois átrios e a distribuição de uma mesma qualidade de sangue a partir do truncus às aa. pulmonares e raízes aórticas.

À vista do exposto, poder-se-á concluir relativamente a *S. an.*, como Bethge (1897, p. 704) para o Urodelo apulmonado que estudou (*Spelerpes*), que no Ginofiôno em questão, exceção feita das vv. pulmonares, não se podem distinguir as artérias das veias essencialmente pela qualidade de sangue. No coração não se dá a separação das duas qualidades de sangue, porquanto a parede interatrial é incompleta e perfurada. Destina-se, pois, o órgão à função de regular a circulação do sangue no corpo. Sòmente a ocorrência de uma função respiratória bastante difusa (pulmões, pele e, possivelmente, cavidade buco-faríngea, esôfago e traquéia), tornaria a existência compatível com um tal aparelho circulatório.

## 5. RESUMO E RESULTADOS

No presente trabalho foram realizadas observações e experiências sobre os aparelhos respiratório e circulatório de *Siphonops annulatus*. Três foram suas finalidades principais: a) determinar a sobrevivência de *S. an.* à supressão da respiração pulmonar, bem como a importância da respiração cutânea neste Ginofiono; b) analisar o mecanismo da respiração pulmonar, e o papel das chamadas oscilações gulares; c) estudar o mecanismo da circulação intracardiaca.

Afim de avaliar quantitativamente os efeitos da supressão da respiração pulmonar, foram determinados previamente pelo método do confinamento e análise de gases com o aparelho de Haldane, valores médios para o consumo de oxigênio, eliminação de CO<sub>2</sub> e quociente respiratório de um determinado número de *S. an.* em condições normais.

A supressão da respiração pulmonar foi conseguida por traqueoectomia parcial ou anestesia. No primeiro método, foi a traquéia exposta e ligada em dois pontos, sendo extirpado o trecho entre as duas ligaduras. Os *S. an.* sobreviveram a esta técnica de impedir a respiração pulmonar. No segundo, com a anestesia por meio da uretana, conseguiu-se a paralização dos movimentos da região gular. Como consequência, cessaram os movimentos de levantamento e abaixamento do assoalho da boca que, à maneira de bomba aspirante-premente, em *S. an.*, como em outros Anfíbios, aspira o ar do exterior através das narinas, insuflando-o em seguida nos pulmões. Impediu-se assim a renovação do meio aéreo de qualquer das cavidades internas de papel respiratório demonstrado (pulmões) ou provavel (boca, faringe, esôfago e traquéia). Como restasse ao animal nestas condições apenas o integumento para a respiração, por esta técnica avaliou-se a troca de gases através do mesmo.

A medida da troca de gases em traqueoectomizados ou anestesiados forneceu valores para o consumo de O<sub>2</sub>, eliminação de CO<sub>2</sub> acentuadamente menores que os de mesmos indivíduos em condições normais. Além disso, revelou que em *S. an.*, tal como nos Anuros e Urodelos, a pele sobretudo elimina CO<sub>2</sub>, fato que se traduziu pelo aumento dos quocientes respiratórios observados nos traqueoectomizados e anestesiados.

Não se impõe, senão sob aspectos gerais, o confronto dos resultados obtidos na medida da troca de gases de *S. an.*, como os dos Anuros e Urodelos em virtude das particulares condições de vida deste Ginofiôno. Entre os Anuros, somente *Ceratophrys* se aproxima pelos hábitos aos Ginofiônos. Todavia, pelo que foi verificado na bibliografia disponível, ainda não foi objeto de estudos visando a troca de gases. A seu respeito pode encontrar

apenas as pesquisas de Willem (1924) sobre a mecânica da respiração pulmonar.

Quanto a este último problema em *S. an.*, foram feitas neste trabalho observações e experiências *in vivo* em animais íntegros ou com exposição dos pulmões, bem como registro gráfico. Cortes histológicos e disseções em vários trechos das vias respiratórias pulmonares elucidaram certas minúcias referentes ao processo respiratório. Em *S. an.* o ar aspirado é, na inspiração, impedido de refluir pelas narinas em virtude de uma válvula situada no início da coana, que é formada por só uma prega mucosa. A rima laríngea, na inspiração, abre-se principalmente por meio de um músculo (m. laryngeus dorsalis) e à custa da elasticidade das cartilagens laterais. Na pausa respiratória mantém-se ela fechada pela ação de um esfíncter (sphincter aditus laryngis). De um modo geral concordam os fatos da mecânica respiratória de *S. an.* com os estabelecidos por Marcus (1923) em *Hypogeophis*. Carece, porém aquele Ginofiono do mecanismo oclisor do esôfago descrito neste último. A observação e o registro gráfico demonstraram que as oscilações gulares em *S. an.* não contribuem para o enchimento dos pulmões, o qual é operado por movimentos muitíssimo mais acentuados do assoalho da boca. O ritmo e a frequência destes últimos foram estudados e registrados.

O septo endatrial incompleto e perfurado e a ausência de um mecanismo seletivo no truncus do coração de *S. an.* permitem deduzir que se misturam os sangues dos átrios e uma mesma qualidade de sangue é distribuída às raízes aórticas e aa. pulmonares. Neste trabalho deu-se prova fisiológica do fenômeno. Os métodos da observação das várias partes do coração transluminado, de pinçamento dos vasos que levam sangue ao órgão e da injeção de sol. de Ringer-nankin nestes últimos confirmaram ser o órgão central da circulação de *S. an.* mero propulsor da corrente sanguínea.

Os resultados das experiências realizadas conduzem, em suma, às seguintes conclusões:

1. *Siphonops annulatus* sobrevive à supressão da respiração pulmonar.

2. Diminuem acentuadamente o consumo de  $O_2$  e eliminação de  $CO_2$  como consequência da supressão.

3. Aumentam os quocientes respiratórios nos *S. an.* de respiração pulmonar abolida, fato que traduz aumento relativo da produção de  $CO_2$  e que permite concluir que a pele neste Ginofiono elimina mais  $CO_2$  do que absorve  $O_2$ .

4. As oscilações gulares em *S. an.* não servem para o enchimento dos pulmões.

5. Uma válvula formada por uma só prega mucosa da coana impede o refluxo do ar na inspiração.

6. Na inspiração, a laringe é repuxada dorsalmente sob ação do levantamento do assoalho bucal e de um músculo retractor (m. retractor). A rima laríngea abre-se em virtude do afrouxa-

mento de um esfíncter (sphincter aditus laryngis), da elasticidade própria das cartilagens laterais e de um dilatador (m. laryngeus dorsalis).

7. De um modo geral, os fatos estabelecidos por Marcus para a mecânica da respiração pulmonar em *Hypogeophis* se aplicam a *S. an.*

8. Em *S. an.* não foi encontrado o mecanismo esôfago oclisor descrito em *Hypogeophis*.

9. O coração de *S. an.* é incapaz de manter separados os sangues que chegam aos átrios. Uma mesma qualidade de sangue é distribuída aos vasos que se originam do truncus. Essas conclusões foram obtidas pelo emprego de técnica análoga à de Vandervael (1933).

## 6. SUMMARY

### STUDIES ON THE PHYSIOLOGY OF THE RESPIRATORY AND CIRCULATORY SYSTEMS OF *Siphonops annulatus* (*Amphibia-Gymnophiona*).

Observations and experiments were performed concerning the respiratory and circulatory systems of *Siphonops annulatus* (*S. an.*), *Amphibia-Gymnophiona*, aiming at the following principal questions: a) The survival of *S. an.* after suppression of pulmonary respiration and the importance of cutaneous respirations; b) the mechanism of pulmonary respiration and the meaning of the rythmical throat movements; c) the mechanism of intracardiac circulation.

1. In order to appraise quantitatively the effects of the suppression of pulmonary respiration mean values for oxygen consumption, CO<sub>2</sub> elimination and respiratory quotient in normal conditions were previously determined, analysing with a Haldane Apparatus the gas-interchanges of animals confined in a closed tube.

2. The suppression of pulmonary respiration was obtained by partial tracheoectomy or anesthesia. In the first case, the trachea was exposed and tied in two different points and the segment between the two ligatures was extirpated. In the second, intraperitoneal injections of 1 or 2 cm<sup>3</sup> of a 5% aqueous solution of urethane produced the paralysis of the movements of lifting and lowering of the floor of the mouth and, in consequence, the aspiration of external air through the nares and its inspiration into the lungs. This procedure prevented also the renewing of the aerial medium of any other internal cavity with a presumable part in respiration (mouth, pharynx, esophagus or trachea). As in these conditions the animals could only use the integument for the gas interchanges, by this method it was possible to value the cutaneous respiration.

3. The measure of the gas interchanges in partially tracheoectomized and in anesthezed individuals provided values for the oxygen consumption and CO<sub>2</sub> elimination markedly inferior to those (See tables 1, 2, 4, 5, 7 and 8) of the same animals in normal

conditions. Besides it showed that in *S. an.*, as in Anurans and Urodeles, CO<sub>2</sub> is principally eliminated through the skin. As a result of this fact, the R. Q. registered with tracheoectomized and anesthetized animals are considerably higher than those of normal individuals (See tables 3, 6 and 9).

4. The study of the mechanism of pulmonary respiration and the meaning of the rythmical throat movements was based on observations *in vivo* on normal animals or on anesthetized ones with the exposure of the lungs. Table 10 furnishes the results of numbering of the frequency of the inspirating movements between the rythmical throat movements. In *S. an.*, during the inspiration, an one-folded valve stops the reflux of the air aspired through the nares (Fig. 3, v). The laryngeal rima in this phasis of the respiratory process is opened principally by the action of a muscle (*m. laryngeus dorsalis*; Figs. 4, 5 and 7: d) and the elasticity of the *cartilagine laterales*. During the respiratory rest a sphincter (*sphincter aditus laryngis*; Figs. 4, 5 and 7: s) closes the glottis. The facts established by Marcus (1923) for the respiratory mechanism of *Hypogeophis* generally agree with those here described for *S. an.*, but the latter does not possess the mechanism of esophagus-occlusion of *Hypogeophis*.

5. The observations and the graphic register (Figs. 9 and 10) showed that the rythmical throat movements cannot fill the lungs. The rythm and frequency of this kind of throat movements were studied. They are possibly related to some bucco-pharyngeal respiration just like in Anurans and Urodeles where such movements, principally in lungless forms, are one of the strongest reasons for accepting the existence of this type of respiration. *S. an.*, with its 200 rythmical throat movements per min. can be interserted between lungless *Sperlerpes* (180) and *Salamandrina perspicillata* (300), both Urodeles regarded as effectively possessing buccopharyngeal respiration.

6. *S. an.* has an incomplete and fenestrated auricular septum (Wiedersheim 1879 and Sawaya 1940) and no spiral valve (Sawaya 1940). On account of these two morphological features the heart of *S. an.* has been considered as not in conditions to maintain the two kinds of blood that arrive to the auricles separated from each other. The heart is a mere blood-impeller. In this work the following physiological arguments are adduced in behalf of this thesis:

a) At each ventricular systole, the pulmonary arches and the aortic or systemic arches fill themselves simultaneously with blood.

b) Right and left auricles contract simultaneously, soon after the sinus systole.

c) The two halves of the ventricle have the same colour, even when the pulmonary ventilation is maintained.

d) The truncus is crossed by a single blood wave at each ventricle systole.

e) When the v. pulmonalis impar is firmly clamped next to its origin, the quantity of blood that arrives to the left auricle diminishes considerably, but this part of the heart does not fade completely, what denotes that it receives blood from other vessels. In fact principally when the v. jugular sinistra is clamped, the left auricle becomes still paler.

f) When the vv. cava posterior, jugulares dextra et sinistra and renalis are clamped, the heart becomes very pale. Notwithstanding that in these conditions only the v. pulmonalis impar can send blood to the heart, at each ventricular systole, the truncus is crossed by a single weak blood flood which penetrates in both aortic and pulmonary arches.

g) If a Ringer-nankin solution is injected through the v. pulmonalis dextra, immediately before its confluence with the v. pulmonalis sinistra, the black liquid is seen crossing successively the v. pulmonalis impar, left and right auricles, ventricle and truncus. From there it is distributed to both aortic and pulmonary arches.

h) When the same solution is injected in the left vessel of the second cranial pair of vv. hepaticae, the black liquid runs succesively through cava, sinus, auricles, ventricle, truncus and from there to the aortic as well as to the pulmonary arches.

These experiments were carried on, according to the technique used by Vandervael (1933), with help of an ophtalmoscopic lamp which transilluminated the parts of the heart that were in observation under the Greenough's microscope.

\* \* \*

### B I B L I O G R A F I A

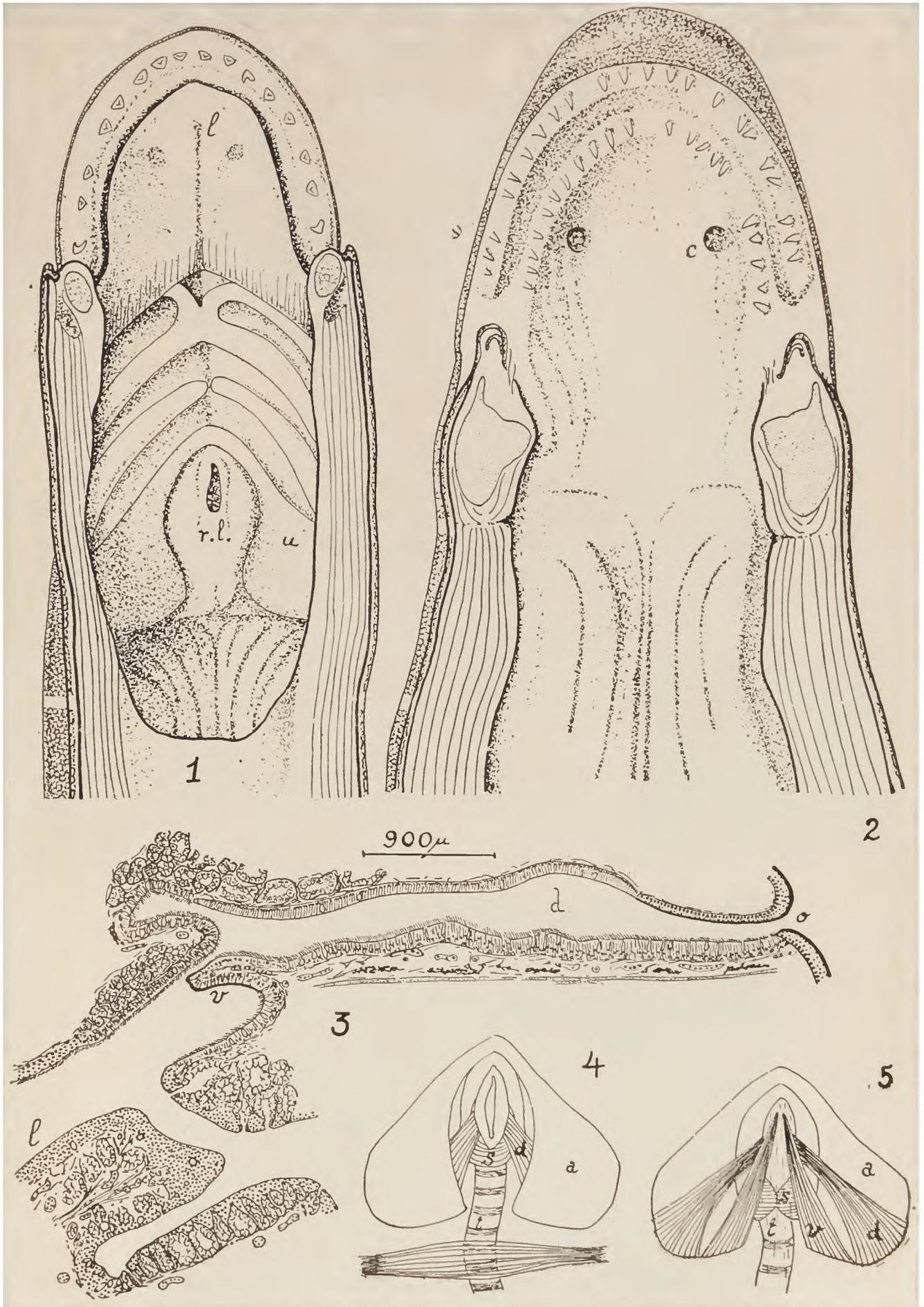
- ACOLAT, L. 1938, Variations de l'appareil respiratoire et de l'appareil circulatoire central chez quelques Gymnophiones. C. R. Ass. Anat. Réun. de Budapest, pp. 3-15. Nancy. AUERSBACH, K. 1930, Beobachtungen über den Ösophagusverschluss einiger Anuren, während der Inspiration. Biol. Zentralbl., v. 50, pp. 113-116. Leipzig. BÁBAK, E. 1921, Die Mechanik u. Innervation der Atmung. Winterstein's Handb. vergl. Physiol., v. 1, 2.° p., pp. 265-1027. Jena. BAER, J. G. 1937, -L'appareil respiratoire des Gymnophiones. Rev. Suisse de Zool., n. 19, v. 44, pp. 353-358. Genève. BETHE, A., BERGMANN, G., EMBDEN, G., e ELLINGER, A. 1928, Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, c. 5, 1325 pp. Berlin. BETHGE, E. 1897, Das Blutgefäßsystem von Salamandra maculata, Triton taeniatus und Spelerpes fuscus, mit Betrachtungen über den Ort der Atmung beim lungenlosen Spelerpes fuscus. Zeitsch. f. wiss. Zool., v. 63, pp. 681-707, t. 42-43. Leipzig. v. BUDDENBROCK, W. 1937, Grundriss der vergleichenden Physiologie. IV + 830 pp., 2 t. Berlin. DOLK, H. e POSTMA, N. 1927, Über die Haut-und-Lungenatmung von Rana temporaria. Zeitschr. f. vergl. Physiol., v. 5, pp. 417-444. Berlin. DONT-CHEFF, L. e KAYSER, C. 1933, Signification des quotients respiratoires inférieurs à 0,7 chez certains poecilothermes. C. R. Acad. Sci., v. 201, f. 9, pp. 474-476. Paris. DRÜNER, L. 1902, Studien zur Anatomie der Anatomie der Zungenbein-Kiemenbogen-und-Kehlkopfmuskeln der Urodelen, I. Zool. Jahrb. Anat. u. Ontog., v. 15, pp. 435-622, t. 25-31, Jena. FISCHER, J. G. 1880, Neue Amphibien und

- Reptilien. Arch. Naturgeschichte, v. 46, pp. 215-227, t. 8-9. Berlin. FUHRMANN, O. e MAYOR, E. 1912, Le genre Typhlonectes. Mém. Soc. Neuchâtel. Sc. Nat., v. 5, pp. 11-138. Neuchâtel. GAUPP, E. 1896, Zur Lehre von dem Athmungsmechanismus bei Frosch. Arch. f. Anat. u. Entwickl., pp. 239-268. Leipzig. GEHWOLF, S. 1923, Der Kehlkopf bei Hypogeophis. Zeitschr. f. Anat., v. 68, pp. 433-454. Berlin-München. GOTO, G. 1934, Über die Hautatmung bei der Salamander. Journ. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ., ser. VI, Zool., v. 2, f. 4, pp. 179-195. Sapporo. GOULSTON, D. 1932, On the metabolism of cold blood animals. Journ. and Proc. Roy. Soc. N. S. Wales, v. 65, f. 1, pp. 51-58. Sydney. HESSE, R. 1924, Tiergeographie auf Ökologischer Grundlage. XII + 613 pp. Jena. JORDAN, H. J. 1927, Übungen aus der vergleichenden Physiologie. 272 pp. Berlin. KALMUS, H. 1933, Lichttod und Atmung. Biol. Zentralbl. v. 53, f. 3-4, pp. 148-152. Leipzig. KLUG, F. 1884, Über die Hautatmung des Frosches. Arch. f. (Anat. u.) Physiol., v. 2, pp. 183-190. Berlin e Leipzig. KROGH, A. 1904, On the cutaneous and pulmonary respiration of the frog. Skand. Arch. f. Physiol., v. 15, pp. 328-419. Berlin und Leipzig. MARCUS, H. 1923, Über den Übergang von der Wasser-zur-Luftatmung mit besonderer Berücksichtigung des Atemmechanismus von Hypogeophis. Beitr. VI. Zeitschr. f. Anat. und Entwicklung., c. 69, f. 69, 4-6, pp. 328-343. Berlin-München. 1935, Zur Stammesgeschichte des Herzens. Beitr. XXI. B. Morphol. Jahrb., v. 76, f. 1, pp. 92-103. Leipzig. MENDES, E. G. 1941, Sobre a respiração (esofágica, traqueal e cutânea) do Siphonops annulatus. Bol. Fac. Fil. Sci. e Letras Univ. S. Paulo, XXII, Zool. n. 5, pp. 283-304. S. Paulo. MERKER, E. 1926, Die Empfindlichkeit feuchthäutiger Tiere im Lichte. Zool. Jahrb. Allg. Zool. u. Physiol., v. 42, pp. 1-174. Jena. NOBLE, G. K. 1931, The Biology of the Amphibia. 577 pp. N. York-London. OZORIO DE ALMEIDA, M. 1923, Sur la séparation des ondes artérielle et veineuse dans l'appareil circulatoire de la grenouille. C. R. Soc. Biol., v. 89, pp. 1019-1021. Paris. ROGERS, C. G. 1931, Textbook of Comparative Physiology. 635 pp. New York. RASMAWAMI, L. S. 1941, Some Aspects of the cranial morphology of Uraeotyphlus narayani Seshachar (Apoda). Rec. Ind. Mus., v. 43, 2.º p., pp. 143-208. Calcutá. SARASIN, P. & F. 1887-1889, Zur Entwicklungsgeschichte und Anatomie der ceylonischen Blindwühle etc. Ergebn. Naturwissens. Forsch. Ceylon., v. 2, f. 3-4, 263 pp., 24 t. Wiesbaden. SAWAYA, P. 1937, Sobre o gênero Siphonops (Wagler 1828) Amphibia Apoda, com descrição de duas variedades novas: S. annulatus Mikan, var. marmoratus e S. paulensis Boett., var. maculatus. Bol. Fac. Fil. Sci. e Letras Un. S. Paulo, IV, Zool. n.º 1, pp. 225-257, t. 30-32. S. Paulo. 1940, Sobre o veneno das glândulas cutâneas, a secreção e o coração de Siphonops annulatus. Bol. Fac. Fil., Sci. e Letras da Univ. S. Paulo, XIX, Zool. n.º 4, pp. 207-270, t. 18-19. S. Paulo. 1941, Sobre a presença de um segundo seio venoso no coração de Amphibio, S. annulatus (Mikan). Arch. Mus. Paranaense, v. 1, pp. 131-136. Curitiba. 1941, Contribuição para o estudo da fisiologia do sistema circulatório do Anfíbio Siphonops annulatus (Mikan). Bol. Fac. Fil., Sci. e Letras da Univ. S. Paulo, XXII, Zool. n. 5, pp. 209-233, S. Paulo. SESHACHAR, B. R. 1939, On a new species of Uraeotyphlus from South India. Ind. Acad. Sci., v. 9, pp. 213-217. Bangalore. VANDERVAEL, F. 1933, Recherches sus le mécanisme de la circulation du sang dans le coeur des Amphibiens Anoures. Arch. Biol., v. 44, pp. 577-606. Paris-Liège. WERNER, F. 1931, Apoda-Gymnophiona. In Kükenthal-Krumbach's Handb. d. Zool., v. 6, f. 2, Lief. 2, pp. 143-208. Berlin-Leipzig. WIEDERSHEIM, R. 1879, Die Anatomie der Gymnophionen. 101 pp., 9 t. Jena. WIELAND, H. 1915, Pharmakologischen Untersuchungen am Atemzentrum. Arch. Exper. Pathol. u. Pharmak., v. 79, pp. 96-117. Berlin. WILDER, H. H. 1896, The Amphibian Larynx Zool. Jahrb. Anat. u. Ontog., v. 9, pp. 273-318, t. 19-21. Jena. WILLEM, L. 1924, IV. Recherches sur la respiration aérienne des Amphibiens. Bull. Class. Sc., v. 10, 5.º sér., pp. 31-37. Bruxelles. 1924, V. Recherches sur la respiration aérienne des Amphibiens. Bull. Class. Sci., v. 10, 5.º sér., pp. 201-218. Bruxelles. WINTERSTEIN, H. 1921, Die physikalisch-chemischen Erscheinungen der Atmung. In Winterstein's Handb. der vergl. Physiol., v. 1, 2.º p., pp. 1-264. Jena.

## 8. ESTAMPAS

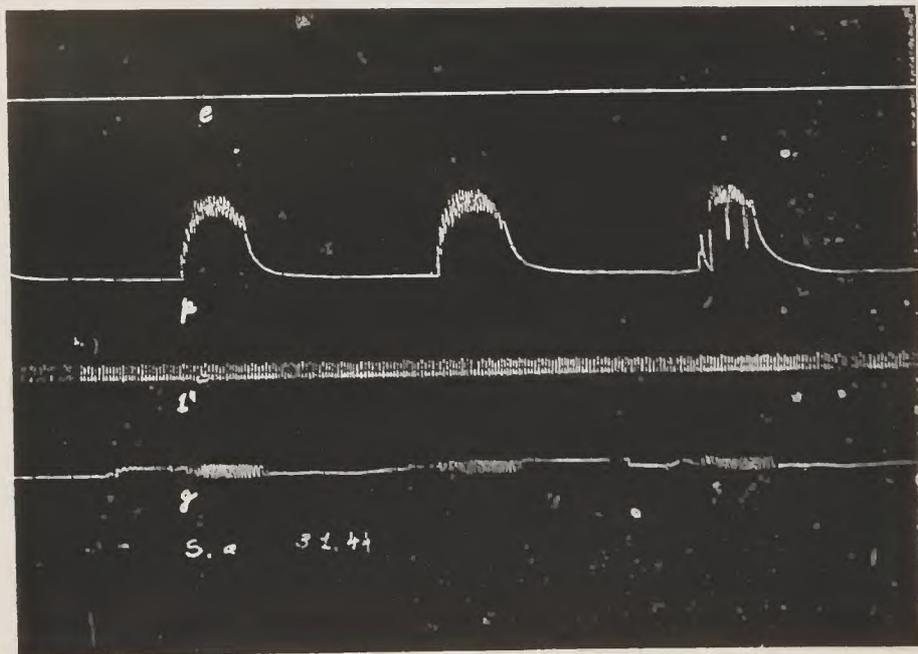
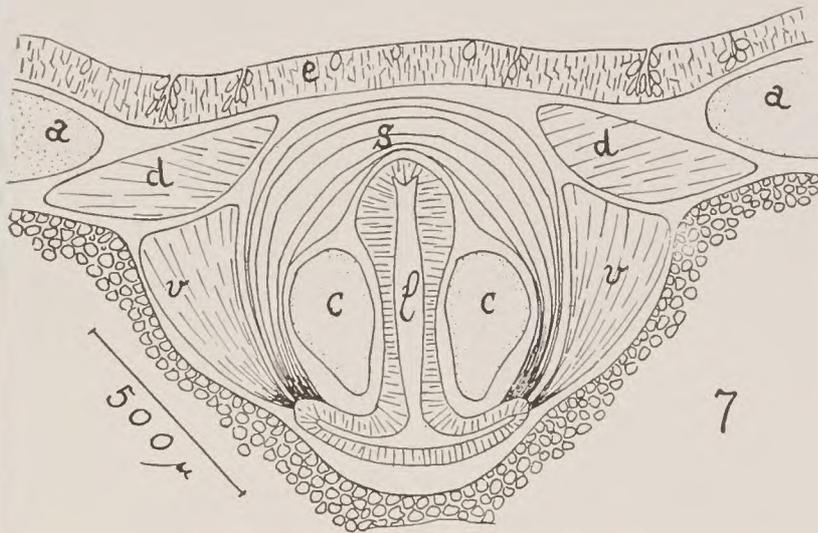
## ESTAMPA I

- Fig. 1 — Vista interna do assoalho da boca de *S. an.* *l*: língua; *r l*: rima laringea; *u*: último arco branquial.
- Fig. 2 — Vista interna do teto da boca de *S. an.* *c*: coâna.
- Fig. 3 — Corte sagital paramediano, mostrando em *S. an.* o duto nasal (*d*), o orifício nasal (*o*), a válvula da coâna (*v*) e a língua (*l*).
- Fig. 4 — Vista dorsal esquemática, obtida por dissecção, da laringe e sua musculatura. *a*: último arco branquial; *d*: m. laryngeus dorsalis; *s*: sphinter aditus laryngis; *t*: trachea.
- Fig. 5 — Vista ventral esquemática, obtida por dissecção da laringe e sua musculatura. *a*: último arco branquial; *d*: m. laryngeus dorsalis; *s*: sphincter aditus laryngis; *t*: trachea; *v*: m. retráctor.



## ESTAMPA II

- Fig. 6 — Microfotografia de um corte transversal passando pela laringe de *S. an.* *a*: extremidades do último arco branquial; *e*: esôfago.
- Fig. 7 — Esquema, retirado da microfotografia da fig. 6, das relações entre a laringe e sua musculatura em *S. an.* *a*: último arco branquial; *c*: cartilagens laterais; *d*: m. laryngeus dorsalis; *e*: epitélio do esôfago; *l*: luz da laringe; *s*: sphincter aditus laryngis; *v*: m. retractor.
- Fig. 8 — Fotografia dos pulmões em *S. an.* em vista ventral. Nota-se a redução do pulmão esquerdo. Tamanho natural.
- Fig. 9 — Registro gráfico simultâneo do enchimento do pulmão (*p*) e dos movimentos da região gular (*g*). Note-se a correspondência entre os movimentos inspiratórios e o enchimento dos pulmões. Tempo: 1".
- Fig. 10 — O mesmo, quando também foi tentado o registro de enchimento do esôfago durante a ventilação pulmonar. *e*: traçado do esôfago; *p*: traçado do pulmão; *g*: traçado dos movimentos da região gular. Aqui é bem mais nítida a coincidência entre o início dos movimentos inspiratórios e o início do enchimento dos pulmões.





# Estudos sôbre a composição da água do mar e do sôro do sangue de *Callinectes danae* Smith

RUBENS SALOMÉ PEREIRA

Docente livre da Universidade de São Paulo.

No desenvolvimento do programa de pesquisas sôbre a composição de soluções perfusoras para *Callinectes danae* Smith (1-2), foi necessário estudar a composição da água da baía de Santos, local em que se capturaram os animais destinados às investigações de laboratório.

O presente trabalho limitou-se a determinar na água do local em que se colhiam os animais os elementos estudados no sangue dos mesmos, para o fim especial de estabelecer-se a composição de soluções perfusoras convenientes para êles. Para tanto, necessário se tornou o estudo de métodos adaptáveis às condições particulares do objeto a analisar-se, e às do material disponível para a realização das pesquisas. Resumem-se, em seguida, os resultados das investigações feitas relativamente à determinação do sódio, do potássio, do cálcio, do magnésio e dos fosfatos na água do mar e no sôro do sangue de *Callinectes danae*.

## I

### ÁGUA DO MAR.

#### *Determinação do sódio.*

Até há pouco, não havia método para dosar-se diretamente o sódio em presença de outros metais, e o processo usual consistia em transformar, após as separações necessárias, o *Na* e o *K* em cloretos, em pesá-los, em precipitar

o K sob a forma de  $(PtCl_6)K_2$  e em deduzir da soma  $ClNa + ClK$  o peso do  $ClK$  calculado a partir da quantidade de  $(PtCl_6)K_2$  obtida. Esse método, além de laborioso, é sujeito a erros consideráveis. Muito mais conveniente é determinar-se o Na sob a forma de acetato triplice de sódio, zinco e uranila (3-4), ou de sódio, magnésio e uranila (5-6). Piper (7) mostrou que quantidades moderadas de  $Cl_2$ , Ca, de  $ClK$ , não exercem influência sobre os resultados, e que a interferência do  $SO_4$  "só se fazia sentir no caso de o Ca achar-se presente em porção tal que a solubilidade do  $SO_4Ca$  fosse excedida. Esse método é excelente para a dosagem do sódio na água do mar, como o demonstram os resultados que adiante se vêm, particularmente à vista da alta percentagem desse metal, que nela se acha, e das quantidades, relativamente baixas em relação a ele, de potássio e de cálcio, assim como de fosfatos e de sulfatos. Nessas condições, é possível determinar-se o Na sem que haja necessidade de separação prévia de certos interferentes. A sensibilidade do método e a alta quantidade de Na permitem, além disso, que se possa diluir consideravelmente a água salgada, o que, concorrendo para abaixar ainda mais a concentração de possíveis elementos perturbadores, ainda maior segurança dá ao processo, e mais simples o torna.

A determinação do sódio processou-se em duas fases, a saber:

- a) precipitação sob a forma de acetato triplice de sódio, magnésio e uranila.
- b) lavagem do precipitado, por centrifugação e por decantação, desenvolvimento da cor dada pelo  $[Fe(CN)_6]K_4$  (4) (8) e determinação fotométrica, por meio do fotômetro gradual de Zeiss-Pulfrich.

## MÉTODO

### Reagentes:

- a) Acetato duplo, de magnésio e uranila, segundo Kahane (6)
 

Acetato de uranila .....	32 gr.
Acetato de magnésio .....	100 gr.
Acido acético glacial .....	20 cm <sup>3</sup>
Alcool a 90° .....	500 cm <sup>3</sup>
Água, q.s. para .....	1000 cm <sup>3</sup>

Dissolvem-se o acetato de uranila e o de magnésio em água fervente, ajuntam-se o ácido acético e o álcool, deixa-se esfriar, dilue-se, por meio de água destilada, a solução obtida até 1 litro e deixa-se em repouso, em lugar fresco e escuro, durante 24 horas, pelo menos. Filtra-se por filtro de vidro de fundo poroso Jena G<sup>3</sup>, a fim de separar-se o precipitado de acetato triplice que se forma devido às impurezas que se contêm nos reagentes, e conserva-se, ao abrigo dos raios solares, em frasco de vidro Pyrex, preferivelmente, e de cor escura.

b) Alcool saturado de acetato triplice de sódio, magnésio e uranila. — Num frasco de 1 litro põem-se alguns grammas de acetato triplice e ajunta-se alcool retificado, a 96°; agita-se o frasco e deixa-se em repouso durante 24 horas. Filtra-se o liquido sobrenadante por filtro

de vidro de fundo poroso, Jena G3, e recebe-se o filtrado em frasco de vidro Pyrex em que se acham alguns gramas de acetato triplíce. Filtra-se imediatamente antes de usar-se.

c) **Ferrocianeto de potássio a 20 %.** — Favorece-se a dissolução por meio do calor, deixa-se esfriar e filtra-se.

d) **Acido acético glacial.**

A amostra de água do mar, filtrada por filtro de vidro de fundo poroso, Jena G3, dilue-se na proporção de 1:10, ou mais; da diluição tomam-se alíquotas correspondentes a 0.005-0.020 cm<sup>3</sup> da amostra, de acôrdo com a provável riqueza da mesma em sódio, e passa-se para um tubo de centrifugação de forma cônica. Ajuntam-se 4 cm<sup>3</sup> de (a), gota a gota e, com o auxílio de bastonete fino, de vidro, agita-se o líquido até êste começar a turvar-se; agita-se ainda, até nitida formação de precipitado. Retira-se o bastonete do tubo e lava-se aquele com cerca de 1 cm<sup>3</sup> de (a), que se ajunta ao tubo em que se efetua a precipitação. Deixa-se em repouso, em lugar fresco, durante uma ou duas horas. Centrifuga-se, então, energicamente, durante cerca de 10 minutos, à velocidade de 2.500-3.000 r.p.m. e decanta-se o líquido sobrenadante. Inverte-se o tubo sobre uma folha de papel de filtro disposto sobre camada de algodão posta em copo de boca larga. Deixa-se escorrer bem e enxuga-se a boca do tubo com papel de filtro sem fibras. Lava-se, então, com (b). Para tanto, por meio de pipeta de extremidade de vasamento fina, injecta-se, soprando-se, cerca de 1 cm<sup>3</sup> do líquido de lavagem e, em seguida, a fim de pôr-se todo o precipitado em suspensão, mantem-se o tubo entre o polegar e o indicador de uma das mãos, com os dedos da outra, dão-se batidas leves, rápidas e sucessivas ao longo do terço inferior do mesmo. Deixam-se escorrer ao longo das paredes mais 5 cm<sup>3</sup> de (b), a fim de bem se lavarem as mesmas. Centrifuga-se durante cerca de 5 minutos, à velocidade indicada, decanta-se o líquido sobrenadante, inverte-se o tubo sobre papel de filtro, como anteriormente. Lava-se o precipitado ainda duas vezes mais e dissolve-se em água destilada quente. Passa-se a solução de acetato triplíce para balão volumétrico de capacidade conveniente e lava-se repetidamente o tubo em que se realizou a precipitação, até se perfazer cerca de 2/3 da capacidade do balão. Resfria-se o líquido à temperatura ambiente, ajuntam-se 0.5 cm<sup>3</sup> de (d) para cada 25 cm<sup>3</sup> de solução colorida. Faz-se ao mesmo tempo um branco dos reativos, de acôrdo com a técnica descrita, e que servirá de líquido de compensação. Determina-se a extinção dada pelo fotômetro gradual de Zeiss-Pulfrich, usando-se cuba de espessura conveniente e interpondo-se o filtro S-43.

A leitura pode fazer-se 5 minutos depois de ajuntados os reagentes e deve-se ter o cuidado de verificar a ausência de turvação no líquido colorido.

A concentração do sódio pode calcular-se por meio da fórmula seguinte:

$$\text{mg Na per } 100 \text{ cm}^3 \text{ de água} = \frac{0.174 k V}{v}$$

em que:

k = coeficiente de extinção; V = volume total da solução colorida; v = volume da água salgada, não diluída, posto em análise.

**Lei de Lambert-Beer. Determinação do coeficiente numérico.** A intensidade da cor desenvolvida segundo a técnica descrita, dentro dos limites de concentração indicados, é determinada pela quantidade de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]\text{K}_2\text{UO}_2$  formada e, indiretamente, no caso de que nos ocupamos, pela de sódio presente no precipitado. A relação existente entre êsses dois fatores — intensidade de cor e quantidade de sódio — permite que se calcule a percentagem dêste metal pela simples multiplicação dos valores da extinção por um fator constante.

O quadro I mostra que a relação entre o coeficiente de extinção, k, e a concentração, c, se traduz por uma reta, o que permite determinar o coeficiente numérico.

## QUADRO I

Relação entre concentração de sódio, c, e coeficiente de extinção, k.

Quantidade de Na per 100 cm <sup>3</sup>	Espessura da cuba usada	D	E	k	c/k
mg	cms.				
0.05	1	51.5		0.292	0.171
0.10	1	26.4		0.578	0.173
0.15	0.50	37	0.432	0.864	0.174
0.20	0.50	27	0.569	1.138	0.176
0.25	0.50	19	0.721	1.442	0.173
0.30	0.25	37.4	0.427	1.708	0.176
0.35	0.25	31.6	0.500	2.000	0.175
0.40	0.25	26.6	0.575	2.300	0.174
0.45	0.25	22.4	0.650	2.600	0.173
0.50	0.25	19	0.721	2.884	0.173
0.55	0.10	48.5	0.314	3.140	0.175
0.60	0.10	45	0.347	3.470	0.173
0.65	0.10	43	0.367	3.670	0.177
0.70	0.10	40.5	0.393	3.930	0.178
0.75	0.10	37	0.432	4.320	0.174
0.80	0.10	35	0.456	4.560	0.175

Média 0.174; Erro médio 0.0018; Erro padrão 0.0005; Coeficiente de variação 1,034%

Influência do volume final da solução corada sobre a extinção. O quadro II mostra que a alteração do volume final da solução corada não exerce, praticamente, influência alguma sobre a extinção, desde que o sódio se mantenha dentro de limites razoáveis de concentração compatíveis com o método descrito.

## QUADRO II

Influência do volume final da solução colorida sobre a extinção. — A quantidade de acetato triplice foi a mesma em todos os casos.

Volume da solução colorida	Espessura da cuba usada	D	E	k
cm <sup>3</sup>	cms			
25	0.5	55	0.260	0.520
50	1.0	56		0.252
100	2.0	55.5	0.256	0.128

**Reprodutibilidade dos resultados.** A fim de verificar-se a reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo método descrito, quando aplicado à determinação do sódio na água do mar, fizeram-se dezesseis dosagens do referido metal numa só amostra. O quadro III reproduz os números obtidos.

### QUADRO III

#### Determinação do sódio na água do mar.

Local da colheita da amostra: Baía de Santos, em frente ao Forte Augusto.

Temperatura da água: 20°C; Maré: Baixa; Data: 30-5-1945; Solução: 1:50.

Volume de água do mar posto em análise	Volume da solução corada	Espessura da cuba usada	D	E	k	Na per 100 cm <sup>3</sup> de água do mar.
cm <sup>3</sup>	cm <sup>3</sup>	cms				mgr.
0.002	50	2.0	44.5	0.352	0.176	765,60
0.004	50	2.0	20	0.699	0.350	761,25
0.005	100	2.0	36	0.444	0.222	772,56
0.006	100	2.0	30	0.523	0.262	759,80
0.008	100	2.0	20	0.699	0.350	761,25
0.010	100	1.0	36.4	—	0.439	763,86
0.012	100	1.0	30	—	0.523	758,35
0.014	100	1.0	24	—	0.620	770,57
0.015	100	1.0	21.4	—	0.670	777,20
0.016	100	1.0	20	—	0.699	760,16
0.018	100	0.5	40	0.398	0.796	769,47
0.020	100	0.5	36	0.444	0.888	772,56
0.022	100	0.5	32.4	0.490	0.980	775,09
0.024	100	0.5	29.6	0.529	1.058	767,05
0.025	100	0.5	28	0.552	1.104	768,38
0.030	100	0.5	22	0.658	1.316	763,28

Média 766,65; Erro médio 5,861; Erro padrão 1,465; Coeficiente de variação 0,764%.

### *Breves comentários sobre o método.*

Por meio do método fotométrico usado no presente trabalho, é possível, como se depreende dos números apresentados, conseguirem-se resultados perfeitamente satisfatórios desde que se observem os pormenores da técnica descrita. Não foi feito, por não se achar dentro dos limites da presente série de pesquisas, estudo exaustivo do método fotométrico; informações amplas podem encontrar-se na literatura citada. As investigações realizadas, porém, nos levam a pensar que, tendo-se o cuidado necessário e realizando-se o trabalho dentro das condições expostas, se podem obter resultados plenamente razoáveis pelo emprêgo do processo descrito. As experiências de reprodutibilidade, e as de recuperação — estas não incluídas no presente trabalho — demonstraram que o método é aconselhável.

No caso particular da água do mar, nenhuma separação de interferentes é necessária, o que, aliás, foi verificado por J. D. Robertson e D. A. Webb (9).

Marenzi (10), que precipita o sódio sob a forma de acetato tríplice de  $Na$ ,  $Zn$  e  $UO_2$ , determina indiretamente o  $Na$  por via fotométrica, por meio da cor dada pelo ferrocianeto de potássio, emprega o fotometro de Zeiss-Pulfrich e usa o filtro S-45.

Os resultados experimentais obtidos por nós e publicados no presente trabalho, têm por fim, apenas, justificar o emprêgo das modificações feitas que se resumiram em usar, na preparação do acetato duplo, o magnésio em lugar do zinco, modificação aconselhável à vista da presença do magnésio na água do mar, em quantidade relativamente grande, e do fato de o magnésio não dar, ao contrário do zinco, precipitado com o ferrocianeto de potássio, o que simplifica a determinação fotométrica. Achámos resultados mais seguros, isto é, leituras mais facilmente reprodutíveis, pelo uso do filtro S-43 do que pelo emprêgo do S-45.

### *Determinação do potássio.*

Para determinar o potássio, empregámos o método fotométrico descrito por Salomé Pereira (11), que, como o demonstram os quadros que se vêm adiante, é perfeitamente adaptável à dosagem do referido elemento na água do mar.

### MÉTODO

#### Reagentes:

- a) Acido sulfúrico 2 N
- b) Vermelho de metila. Dissolvem-se 0.02 gr. do indicador em álcool etílico a 60% e perfaz-se o volume de 100 cm<sup>3</sup>.
- c) Carbonato de sódio. Solução saturada a frio.

d) Cobaltinitrito de prata. Dissolvem-se 25 gr. de cobaltinitrito de sódio em 150 cm<sup>3</sup> numa solução de nitrito de sódio em que há 50 gr. deste sal. Ajuntam-se, aos poucos, 5 cm<sup>3</sup> numa solução de nitrato de prata a 40 gr. por 100 cm<sup>3</sup>, sob agitação constante, e dilue-se a 200 cm<sup>3</sup> por meio de água destilada. Adicionam-se 2 cm<sup>3</sup> de ácido acético glacial e faz-se uma corrente de ar passar pela solução até não haver mais desprendimento de gases. Coloca-se o reagente na geladeira, à temperatura de 4° - 6°; 12-24 horas mais tarde filtra-se

por filtro de vidro poroso, Jena G3, com o auxílio de leve sucção, e conserva-se o filtrado em frasco escuro, de rolha esmerilhada, na geladeira, à temperatura indicada. Filtra-se imediatamente antes de usar-se. Tôdas as semanas faz-se uma corrente de ar passar pela solução, e o reagente é renovado mensalmente.

e) **Líquidos de lavagem.** Água destilada. Acetona a 50%. Acetona pura.

A acetona usada deve dar reação negativa com o nitrato de prata.

f) **Ácido clorídrico,**  $d=1.19$ .

g) **Solução alcóolica de dimetilglioxima.** Dissolve-se 1 gr. de dimetilglioxima em álcool retificado a 95% e perfaz-se o volume de  $100\text{ cm}^3$  com o solvente.

h) **Solução alcóolica de benzidina.** Solução a 1 gr. de benzidina per  $100\text{ cm}^3$  de álcool retificado a 95%. Conserva-se em vidro escuro, de rolha esmerilhada.

A amostra de água salgada em que se vae dosar o potássio filtra-se por filtro de vidro poroso, Jena G3, e dilue-se na proporção de 1:5 ou 1:10. Da diluição toma-se aliquota correspondente a  $0.02\text{-}0.10\text{ cm}^3$  da amostra e passa-se para tubo de centrifugação de forma cônica e de diâmetro reduzido na parte inferior, graduado à altura de 1-5-7,5 e  $10\text{ cm}^3$ . Leva-se o mesmo ao banho de ar, cuja temperatura gradualmente se eleva a  $120^\circ\text{ - }130^\circ\text{C}$ , e evapora-se cuidadosamente o líquido até secura. Ajuntam-se  $0.5\text{ cm}^3$  de (a) e de novo se evapora em banho de ar, como anteriormente. Aquece-se sobre chama pequena, cuidadosamente, para eliminar-se, de todo, o cloro presente. Esfria-se o tubo, ajuntam-se  $0,5\text{ cm}^3$  de água destilada e, em presença de uma gota de (b), alcaliniza-se cuidadosamente a solução por meio do reagente (c). Mergulha-se, então, o tubo em banho-maria fervente, durante cerca de 5 minutos. Se houver formação de precipitado, ou de turvação, esfria-se a solução, centrifuga-se, passa-se o líquido sobrenadante para outro tubo de centrifugação semelhante ao já usado. Dissolve-se o precipitado em algumas gotas de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  2 N, adicionam-se  $0.5\text{ cm}^3$  de água destilada, uma gota de (b) e repete-se a precipitação por meio de (c), como anteriormente. Centrifuga-se e o líquido sobrenadante decanta-se para o segundo tubo de centrifugação. A solução assim obtida ajunta-se, gota a gota  $\text{CH}_3\text{COOH}$  5 N até desenvolver-se cor vermelha. Mergulha-se o tubo em banho-maria fervente para eliminar-se todo o  $\text{CO}_2$  formado no processo. Se necessário, adiciona-se cuidadosamente  $\text{CH}_3\text{COOH}$  diluído, cerca de 1 N, a fim de manter-se o líquido levemente ácido, e reduz-se o volume a  $1\text{ cm}^3$ . Esfria-se o tubo e ajunta-se  $1\text{ cm}^3$  de (d). Leva-se a solução à geladeira, à temperatura de  $4^\circ\text{-}6^\circ\text{C}$ , e duas horas mais tarde, pelo menos, centrifuga-se durante cerca de 15 minutos, à velocidade de 2.500-3.000 r.p.m. Aspira-se o líquido sobrenadante, até ficarem apenas  $0.5\text{ cm}^3$  do mesmo, por meio de capilar de extremidade voltada para cima, de sorte que o precipitado não se distúrbe. Ajunta-se então  $1\text{ cm}^3$  de água destilada, gota a gota, deixando-se o líquido correr ao longo das paredes. Formam-se, assim, duas camadas de densidade desigual: a superior, formada de solução muito diluída do reagente, e a inferior que se constitui do mesmo reagente quase nada diluído. A fim de se misturarem tais camadas sem se perturbar o precipitado, inclina-se o tubo cuidadosamente até este tomar posição quase horizontal, e rapidamente se faz o mesmo volver à posição primitiva. Repetem-se êsses movimentos 3 ou 4 vezes, e em seguida, lava-se o interior do tubo com  $4\text{ cm}^3$  de água destilada. Centrifuga-se o líquido durante cerca de 10 minutos, à velocidade indicada, e aspira-se, como anteriormente. Repetem-se as operações de lavagem, e desta vez usa-se acetona a 50%, em lugar de água destilada. Lava-se em seguida com acetona pura. Se se tomam precauções para bem acamar-se o precipitado, pode-se, nessa altura, decantar diretamente o líquido sobrenadante sem que haja perda de precipitado. Inverte-se o tubo sobre papel de filtro posto sobre camada de algodão colocada em copo de boca larga, deixa-se que o excesso de líquido escorra bem, enxuga-se a boca do tubo com pano limpo ou com papel de filtro sem fibras. Repete-se a lavagem com acetona pura. Nesta altura o líquido deve ser inteiramente incolor e, se assim não estiver, de novo se lavará com acetona. Ajunta-se  $0.1\text{ cm}^3$  de (f) e leva-se ao banho de ar cuja temperatura gradualmente se eleva até  $150^\circ\text{-}160^\circ\text{C}$ . Depois de eliminar-se inteiramente todo o excesso de ácido, resfria-se o tubo, ajunta-se água destilada; mergulha-se o tubo em banho-maria fervente, de novo se esfria. Adicionam-se  $0.5\text{ cm}^3$  de (g) e  $0.2\text{ cm}^3$  de (h), para volume final de  $10\text{ cm}^3$ ; dilue-se convenientemente o conteúdo do tubo com água destilada e homogeniza-se bem a solução corada. Faz-se ao mesmo tempo, exatamente sob as mesmas condições, um branco dos reativos, que servirá de líquido de compensação. Determina-se a extinção dada pelo fotometro gradual de Zeiss-Pulfrich, interpondo-se o filtro S-43, usando-se cuba de espessura apropriada, de sorte que a extinção, E, se situe entre 0.15 e 0.80. A leitura faz-se entre 10 e 40 minutos depois da adição dos reagentes.

A concentração do potássio pode ser calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\text{mg de K per 100 cm}^3 = \frac{0.674 k V}{v}$$

em que:

$k$  = coeficiente de extinção;  $V$  = volume total da solução corada;  $v$  = volume da água do mar tomado para a determinação.

**Reprodutibilidade dos resultados.** Por meio do método descrito, obtivemos os resultados que se vêm no quadro IV.

#### Q U A D R O I V

##### Reprodutibilidade dos resultados

##### Determinação do potássio na água do mar.

Local da colheita da amostra: Baía de Santos, em frente ao Forte Augusto.

Temperatura da água: 20°C; Maré: Baixa; Data: 30-5-1945.

Diluição da água do mar	Alíquota tomada para análise	Volume da água salgada correspondente à alíquota tomada	Volume da solução corada	Espessura da cuba usada	D	E	k	K per 100 cms de água do mar
	cm <sup>3</sup>	cm <sup>3</sup>	cm <sup>3</sup>	cms.				mgr.
1:5	0.2	0.04	10	2	38	0.420	0.210	35.39
1:5	0.2	0.04	10	2	38	0.420	0.210	35.39
1:5	0.3	0.06	10	2	24	0.620	0.310	34.82
1:5	0.3	0.06	10	2	23.4	0.631	0.316	35.50
1:5	0.4	0.08	7.5	1	27	—	0.569	35.95
1:5	0.4	0.08	10	2	14	0.854	0.427	35.97
1:5	0.5	0.10	7.5	1	20	—	0.699	35.33
1:5	0.5	0.10	7.5	1	20	—	0.699	35.33
1:10	0.2	0.02	10	3	48	0.319	0.106	35.72
1:10	0.2	0.02	10	3	49	0.310	0.103	34.71
1:10	0.3	0.03	10	2	48.5	0.314	0.157	35.27
1:10	0.3	0.03	10	3	35	0.456	0.152	34.15
1:10	0.5	0.05	7.5	1	44	—	0.357	36.09
1:10	0.5	0.05	10	2	30	0.523	0.262	35.35
1:10	0.7	0.07	7.5	1	31.6	—	0.500	36.11
1:10	0.7	0.07	7.5	1	33	—	0.482	34.81

Média 35.37; Erro médio 0.563; Erro padrão 0.136; Coeficiente de variação 1.59%.

Esses números mostram que o método se aplica perfeitamente, desde que se siga rigorosamente a técnica descrita, ao caso particular da dosagem do potássio na água do mar. Para discussão mais ampla do assunto, consulte-se o trabalho citado (11).

*Determinação do cálcio.*

Apesar das dificuldades, especialmente no caso de certas matérias, que a separação quantitativa do cálcio sob a forma de oxalato apresenta, os métodos de determinação baseados nêsse principio são os que mais geralmente se recomendam. Para discussão do assunto convem consultar, entre outros, os trabalhos de Sendroy (12), o de Kolthoff e Sandell (13) o de Robertson e Webb (9).

A técnica adotada no presente trabalho foi a descrita em (14).

A amostra da água do mar filtra-se por filtro de vidro de fundo poroso, Jena G3, e dilue-se na proporção de 1:5 ou de 1:10. Da diluição tomam-se aliquotas correspondentes a 0.05-0.20 cm<sup>3</sup> da amostra que se transferem para tubos de centrifugação de forma cônica, de diâmetro reduzido na extremidade inferior, graduados à altura de 5-7.5 e 10 cm<sub>3</sub>, e precipita-se o cálcio exatamente como se escreveu em (14). O (COO)<sub>2</sub> Ca lavado, é dissolvido em CIH, tratado pelo perhydrol, e o Ca se precipita sob a forma de (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Ca<sub>3</sub>. Determina-se o P do precipitado por via fotométrica. E' aconselhável, à vista da quantidade de Mg presente na água salgada, dissolver-se o (COO)<sub>2</sub> Ca e reprecipitar-se o mesmo.

Por meio dêsse método, obtivemos os resultados que se vêm no quadro V.

QUADRO V

Reprodutibilidade dos resultados.

Determinação do calcio na água do mar.

Local da colheita da amostra: Baía de Santos, em frente ao Forte Augusto.

Temperatura da água: 20°C; Maré: Baixa; Data: 30-5-1945; Diluição: 1:10.

Aliquota tomada para a análise	água salgada correspondente à aliquota tomada	Volume de solução corada	Espessura da cuba usada	D	E	k	Ca per 100 cm <sup>3</sup> de água do mar
cm <sup>3</sup>	cm <sup>3</sup>	cm <sup>3</sup>	cms				mgr.
0.5	0.05	10	1	37	—	0.432	40.69
0.5	0.05	10	1	37.4	—	0.427	40.22
0.5	0.05	7.5	1	26.6	—	0.575	40.62
1.0	0.10	10	1	14	—	0.854	40.22
1.0	0.10	10	1	14.5	—	0.839	39.52
1.0	0.10	10	1	13.8	—	0.860	40.51
1.5	0.15	10	0.5	24	0.620	1.240	38.94
1.5	0.15	10	0.5	24.6	0.609	1.218	38.25
1.5	0.15	10	0.5	23.4	0.631	1.262	39.63
2.0	0.20	10	0.5	14	0.854	1.708	40.22
2.0	0.20	10	0.5	13.6	0.867	1.734	40.84
2.0	0.20	10	0.5	14.5	0.839	1.678	39.52

Média 39.93; Erro médio 0.747; Erro padrão 0.225; Coeficiente de variações 1.871%.

*Determinação do magnésio*

O método escolhido foi o que se baseia na precipitação do magnésio por meio da oxina, depois de haver-se isolado o cálcio sob a forma de  $(\text{COO})_2 \text{Ca}$ , e na determinação indireta do metal por via fotométrica, depois de desenvolver-se a cor por meio da copulação com ácido naphthionico diazotado, de acôrdo com a técnica descrita em (15).

No quadro VI dão-se os resultados obtidos pela aplicação desse método à dosagem do magnésio na água do mar.

— A amostra, depois de filtrada por filtro de vidro de fundo poroso, Jena G3, dilue-se na proporção de 1:10. Da diluição tomam-se alíquotas correspondentes a 0.05-0.20  $\text{cm}^3$  da água submetida à análise, precipita-se o Ca como  $(\text{COO})_2 \text{Ca}$ , e da solução assim liberta de Ca, isola-se o Mg como oxinato. Dissolve-se este em cerca de 5  $\text{cm}^3$  de  $\text{ClH N}$ , faz-se volume conveniente por meio de água destilada; da solução clorídrica assim obtida tomam-se alíquotas correspondentes a 0.01-0.03  $\text{cm}^3$  da água do mar e desenvolve-se a cor segundo a técnica descrita.

## QUADRO VI

Determinação do magnésio na água do mar.

Reprodutibilidade dos resultados.

Local da colheita da amostra: Baía de Santos, em frente ao Forte Augusto.

Temperatura da água: 20°C; Maré: Baixa; Data: 30-5-1945.

Água do mar correspondente à alíquota tomada p/desenvolvimento da cor	Volume da solução corada	Espessura da cuba usada	D	E	k	Mg per 100 $\text{cm}^3$ da água do mar
$\text{cm}^3$	$\text{cm}^3$	cms				mgr.
0.01	50	1	40	—	0.398	99.10
0.01	50	1	41	—	0.387	96.36
0.01	100	2	40	0.398	0.199	99.10
0.02	100	2	16.2	0.791	0.396	98.60
0.02	100	1	40.5	—	0.393	97.86
0.02	100	2	16.6	0.780	0.390	97.11
0.03	100	1	25	—	0.602	99.93
0.03	100	1	26	—	0.585	97.11
0.03	100	1	25.4	—	0.595	98.77
0.05	200	1	31.6	—	0.500	99.60
0.05	200	1	32.4	—	0.490	97.61
0.05	200	1	32	—	0.495	98.60

Média 98.31; Erro médio 1.039; Erro padrão 0.317; Coeficiente de variação 1.118%.

*Determinação do fósforo.*

O método usado para determinação do fósforo, foi o fotométrico descrito por Salomé Pereira (16).

Dois a 20 cm<sup>3</sup> da amostra filtrada por filtro de vidro de fundo poroso, Jena G<sup>3</sup>, põem-se em tubo de vidro "Pyrex" de tamanho conveniente, graduado à altura de 10 cm<sup>3</sup> e evaporam-se até pequeno volume. Ajuntam-se, então, tantos cm<sup>3</sup> de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 10 N quantos os necessários para transformar os sais presentes em sulfatos e para deixar a solução ácida, de normalidade às voltas de 0.1-0.4 N. Aquece-se a solução sobre chama pequena, cuidadosamente, até formação de abundantes vapores ácidos. Esfria-se o tubo, dilue-se por meio de água destilada, até cerca de 8 cm<sup>3</sup> e desenvolve-se a cor conforme o método citado.

A aplicação desse método à determinação do P na água do mar não apresenta dificuldades, e o coeficiente de variação é de 1.5%.

Determinação do Na, do K, do Ca, do Mg e do P na água salgada.

Os métodos descritos, aplicados à análise das amostras de água do mar recebidas, abaixo discriminadas, permitiram a organização do quadro VII.

Amostra	Data da colheita	Local da colheita
I	5-3-1945	Baía de Santos, em frente ao Forte Augusto.
II	5-3-1945	A altura da Ilha das Palmas.
III	5-5-1945	Baía de Santos, em frente ao Forte Augusto.
IV	30-5-1945	Baía de Santos, em frente ao Forte Augusto.
V	5-5-1945	Baía de Santos, em frente ao Forte Augusto.

## Q U A D R O VII

Amostra	Na mg per 100 cm <sup>3</sup>	K mg per 100 cm <sup>3</sup>	Ca mg per 100 cm <sup>3</sup>	Mg mg per 100 cm <sup>3</sup>	P mg per 100 cm <sup>3</sup>
I	394.00	16.17	11.08	20.14	0.15
II	995.65	35.45	32.03	97.60	0.05
III	1063,51	44.21	26.80	132,73	0.002
IV	766,65	35.37	39.93	98,31	0.005
V	853,30	60.00	50,00	111,55	0.003

## II

SÔRO DO SANGUE DE *Callinectes danae* SMITH.*Material e Métodos*

O sangue (hemolinfa) foi obtido por punção das artérias dos quelípodos e imediatamente transferido para um tubo de centrifugação e centrifugado energicamente durante cerca de 20 minutos. Deixa-se em repouso e, ao cabo de 12 horas, mais ou menos, de novo se centrifuga. O coágulo, de natureza gelatinosa, pode ser retirado por meio de fio de platina, o que, por vêzes, permite que se obtenha um pouco mais de sôro.

A determinação dos elementos minerais foi realizada em duas fases:

- a) incineração do material.
- b) determinação dos elementos na solução das cinzas.

**Incineração do material.** Foi escolhida a incineração por via úmida, de acôrdo com a técnica descrita em (11) e realizada da seguinte forma:

O sôro obtido é medido em pipeta de Kahn e transferido quantitativamente para um tubo de vidro Pyrex, ou preferivelmente, de quartzo, graduado à altura de 1, 2, 2.5 e 5 cm<sup>3</sup> em que se acham 0.5 cm<sup>3</sup> de água destilada. Lava-se repetidamente a pipeta com o líquido que se encontra no tubo, ajunta-se 1 cm<sup>3</sup> de mistura nitro-perchlorica (NO<sub>3</sub>H d = 1.40 e ClO<sub>4</sub>H d = 1.67 na proporção de 3:1) e aquece-se no banho de ar cuja temperatura se eleva gradualmente a cerca de 145°C. A solução ácida ferve calmamente e os vapores de óxidos de azoto se eliminam. No caso de o líquido enegrecer-se, ajuntam-se quantidades exatamente medidas da mistura ácida e de novo se aquece como anteriormente, até obter-se solução incolor, ou levemente amarelada. Aumenta-se, então, vagarosamente, a temperatura até cerca de 205°C. Depois de conseguir-se resíduo incolor, ou de leve amarelado, eleva-se a temperatura até às alturas de 250°C, de modo a eliminar-se todo o excesso de ácido perclórico. Aquece-se, então, o tubo mais vigorosamente, à chama dum bico de Bunsen, e o aquecimento se continúa até destruição total dos percloratos e cessação completa de desprendimento de vapores. O resíduo dissolve-se, com o auxílio do calor, se necessário, em quantidade tal de ClH 0.1 N que a acidez da solução, depois de se haver feito volume final conveniente com água destilada, se situe às voltas de 0.05 N. Faz-se, ao mesmo tempo, exatamente sob as mesmas condições, um "branco". Da solução das cinzas obtida, tomam-se alíquotas para a dosagem dos vários elementos, e idênticas porções se tomam do "branco", para fins de compensação.

**Determinação do sódio.** Da solução clorídrica das cinzas medem-se partes correspondentes a 0.005-0.020 cm<sup>3</sup> de sôro, passam-se para tubos de centrifugação, de forma cônica, que se aquecem cuidadosamente no banho de ar, elevando-se aos poucos a temperatura, a cerca de 120-130°C, até evaporação total do líquido. Gradualmente se alteia a temperatura até às volas de 150°-160°C e de todo se elimina o excesso de ácido. Esfriam-se os tubos e o resíduo que nêles se encontra dissolve-se em 0.5 cm<sup>3</sup> de água destilada. Nesta solução determina-se o sódio de acôrdo com o método indicado.

**Determinação do potássio.** O potássio foi determinado segundo o método descrito em (11).

**Determinação do cálcio.** Depois de se isolarem os metais precipitáveis pela oxina em meio ácido (pH = 4.5-5.3), o cálcio é dosado como se descreve em (14).

**Determinação do magnésio.** Determinou-se o magnésio por via fotométrica de acôrdo com o que descreve em (15).

**Determinação do fósforo total.** Esta se fez como anteriormente (16).

*Resultados.*

Os métodos descritos, aplicados à determinação dos elementos referidos — Na, K, Ca, Mg e P — na água do mar e no sôro do sangue de *Callinectes*

*danae*, permitiram a obtenção dos dados que se encontram nos quadros que em seguida publicamos.

No quadro VIII, a composição dos sôros não corresponde à análise de animal por animal: a fim de obter-se maior quantidade de material, sangrava-se número variável de animais, misturavam-se as hemolinfas obtidas e da mistura se preparava o soro. A apreciação dos resultados, porém, levou-nos a abandonar esse modo de proceder. Verificações cuidadosas dos métodos expostos convenceram-nos de que, mesmo no caso de se conseguir apenas 0.1 cm<sup>3</sup> — e às vezes até um pouco menos — de soro, era possível dosar satisfatoriamente os elementos estudados. Os quadros que se seguem ao VIII, referem-se ao soro obtido de indivíduo por indivíduo.

QUADRO VIII

Na, K, Ca, Mg e P no soro do sangue do *Callinectes danae* Smith.

Soro resultante da mistura da hemolinfa de vários animais.

Local da colheita da amostra: Baía de Santos, em frente ao Forte Augusto.

Data da colheita do material: 5 de março de 1945.

Soro n.º	Sangue de	Na		K		Ca		Mg		P
		mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m.eq.per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m.eq.per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m.eq.per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m.eq.per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>
1	4 ♀	681.21	296.22	40.57	10.38	36.88	18.40	39.89	32.80	11.37
2	2 ♀	1033.13	449.25	45.83	11.72	39.45	19.19	40.71	33.48	6.04
3	2 ♀	940.69	409.05	26.15	6.69	31.75	15.84	23.61	19.42	5.40
4	1 ♀	935.25	406.68	29.93	7.66	42.39	21.15	22.11	18.18	6.83
5	3 ♂ 2 ♀	935.25	406.68	33.97	8.69	45.59	22.75	33.57	27.61	6.50
6	2 ♂ 3 ♀	853.69	371.22	28.04	7.17	41.12	20.52	32.97	27.11	7.28
7	11 ♀	543.75	236.44	34.62	8.86	43.38	21.65	30.88	25.39	7.62
8	11 ♀	578.55	251.58	31.34	8.02	40.22	20.07	34.36	28.26	8.24
9	10 ♂	769.95	334.80	38.62	9.88	33.35	16.64	22.31	18.35	4.22
10	1 ♂	683.31	297.13	48.53	12.41	51.81	25.85	37.85	31.13	6.64
11	4 ♂	635.10	276.17	42.89	8.41	41.16	20.54	39.84	32.76	2.77
MÉDIA		789.99	343.51	35.50	9.08	40.65	20.28	32.55	26.77	6.63

Nota: Essa média, consideradas as condições em que foi obtida, é dada apenas a título de informação.

Amostra	Composição da água do local da colheita dos animais									
I	394.00	171.33	16.17	4.14	11.08	5.73	20.14	16.56		

## QUADRO IX

Na, K, Ca, Mg e P no sôro do sangue do *Callinectes danae* Smith.

Sôro obtido pela sangria de animal por animal.

Local da colheita da amostra: Baía de Santos, em frente ao Forte Augusto.

Data da colheita dos animais: 5 de maio de 1945.

Sôro n.º	Sexo	Na		K		Ca		Mg		P
		mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>	
1	♂	1046.17	454.92	50.20	12.84	58.00	28.94	39.96	38.86	2.69
2	♀	972.66	422.95	51.73	13.23	60.10	29.99	39.05	32.11	2.36
3	♀	990.06	430.52	51.24	13.11	61.23	30.55	39.24	32.27	2.69
4	♀	957.00	416.14	49.68	12.71	58.45	29.17	38.90	31.99	2.42
5	♀	990.06	430.52	50.66	12.96	61.98	30.93	38.35	31.54	2.17
6	♀	973.22	423.19	50.66	12.96	61.58	30.73	38.99	32.06	2.39
7	♀	978.27	425.39	51.05	13.06	59.00	29.44	39.90	32.81	2.48
8	♀	936.12	407.06	48.53	12.41	57.70	28.79	38.35	31.54	2.55
9	♀	930.90	404.79	40.55	10.37	50.83	25.36	38.60	31.74	—
10	♀	1006.05	437.47	51.22	13.10	59.19	29.54	42.66	35.08	—
11	♂	1042.26	453.22	40.66	10.40	71.03	35.44	30.64	31.78	—
12	♂	984.07	427.91	38.60	9.90	47.80	23.85	38.40	31.58	—
13	♀	991.80	431.27	44.00	11.25	61.58	30.73	38.93	32.01	—
14	♀	991.80	431.27	42.35	10.83	68.00	33.93	42.99	35.35	—
15	♂	967.87	420.87	41.91	10.72	62.00	30.94	40.66	33.41	—
16	♂	1013.55	440.73	42.46	10.86	71.63	35.74	43.41	35.70	—
17	♂	1079.04	469.21	39.32	10.07	68.00	33.93	38.18	31.40	—
		991.23	431.03	46.17	11.81	61.06	30.47	39.71	32.66	

Amostra \*      Composição da água do local da colheita dos animais  
 III      1063.51    432.46    44.21    11.31    26.80    13.37    132.73    109.15

## QUADRO X

Na, K, Ca e Mg no sôro do sangue de *Callinectes danae* Smith.

Sôro obtido pela sangria de animal por animal.

Local da colheita da amostra: Baía de Santos, em frente ao Forte Augusto.

Data da colheita do material: 30 de maio de 1945.

Nota: Os animais depois de colhidos ficaram 16 horas na água doce e em seguida foram sangrados.

Sôro n.º	Sexo	Na		K		Ca		Mg	
		mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>
1	♂	984.68	428.18	55.16	14.11	22.36	11.16	57.72	47.47
2	♀	1205.71	526.03	59.46	15.21	45.08	22.50	58.32	47.96
3	♀	1127.96	490.43	47.18	12.07	24.89	12.32	47.76	39.28
4	♀	1102.65	479.48	51.65	13.98	24.50	12.23	58.89	48.43
5	♀	907.32	394.54	38.52	9.55	33.81	16.87	49.09	40.37
6	♀	1040.84	452.60	53.26	13.62	31.90	15.92	65.74	54.06
7	♀	1065.32	463.24	53.26	13.62	45.08	22.50	76.64	63.02
		1062.64	462.08	51.64	13.21	32.48	16.21	59.17	48.66

Amostra      Composição da água do local da colheita dos animais  
 IV      766.65    333.37    35.37    9.05    59.93    19.93    98.31    80.85

\* A amostra II de água corresponde a local onde não foi feita captura de *Callinectes*.

**QUADRO XI**

Na, K, Ca e Mg no soro do sangue de *Callinectes danae* Smith.

Soro obtido pela sangria de animal por animal.

Local da colheita da amostra: Baía de Santos, em frente ao Forte Augusto.

Data da colheita do material: 5 de julho de 1945.

Soro n.º	Na		K		Ca		Mg	
	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>
1	1028.80	447.36	57.62	14.74	72.43	36.14	48.01	39.48
2	1164.90	506.54	57.71	14.76	71.90	35.83	47.21	38.82
3	1165.80	506.94	59.09	15.11	69.24	34.55	54.45	44.78
4	1170.15	508.33	60.24	15.41	74.63	37.24	55.23	45.46
	1132.41	492.41	58.67	15.01	72.05	35.95	51.24	42.14
Amostra	Composição da água do local da colheita dos animais							
V	853.39	371.05	60.00	15.35	50.00	24.95	111.55	91.74

**QUADRO XII**

Média da composição do soro de *Callinectes danae* Smith.

	Na		K		Ca		Mg	
	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>	mgr. per 100 cm <sup>3</sup>	m. eq. per 1000 cm <sup>3</sup>
I — Média da composição de todos os séros analisados (Quadros VIII, IX, X e XI).....	961.77	418.22	45.42	11.62	51.30	25.60	42.36	34.84
II — Média da composição dos séros obtidos de indivíduo por indivíduo (Quadros IX, X e XI).....	1029.25	417.58	49.32	12.62	55.49	31.68	43.22	38.00
III — Média da composição dos séros dos indivíduos sangrados no local da colheita (Quadros IX e XI) .....	1018.12	442.72	48.55	12.42	63.15	31.52	41.90	34.16

NOTA: Os dados constantes dos quadros VIII a XII serviram para elaboração da Tabela I do trabalho de Sawaya (v. este Boletim p. 8).

Soluções perfusoras para *Callinectes danae* Smith.

	ClNa		ClK		Cl2Ca		Cl2Mg	
	gr. per 1000 cm <sup>3</sup>	m M per 1000 cm <sup>3</sup>	gr. per 1000 cm <sup>3</sup>	m M per 1000 cm <sup>3</sup>	gr. per 1000 cm <sup>3</sup>	m M per 1000 cm <sup>3</sup>	gr. per 1000 cm <sup>3</sup>	m M per 1000 cm <sup>3</sup>
I	24.446	418.22	0.866	11.62	1.421	12.80	1.660	17.42
II	26.162	447.58	0.940	12.62	1.537	13.84	1.810	19.00
III	25.877	442.72	0.926	12.42	1.748	15.75	1.641	17.23

Os resultados dos trabalhos experimentaes feitos com o emprego dessas soluções serão expostos por Sawaya (v. este Bol. pag. 16).

As soluções perfusoras que em seguira se propõem baseiam-se nos dados fornecidos pela análise do sôro de *Callinectes danae* resumidos nos quadros anteriores, e as diferenças que entre elas se notam devem-se ao critério seguido no aproveitamento dos dados conseguidos.

A solução I funda-se na média de todos os sôros analisados, incluídos os que se obtiveram pela mistura da hemolinfa de vários animais. Para se compor a solução II, excluíram-se os dados que se vêm no quadro VIII e consideraram-se, apenas, os resultados das análises dos sôros tomados de indivíduo por indivíduo. Na composição do líquido III, não se levaram em conta os resultados expostos no quadro X, a fim de se eliminar a possível influência da água doce sôbre a concentração dos elementos do sôro durante as 16 horas em que nesta permaneceram os animais, antes de se sangrarem.

## SUMMARY

STUDIES ON COMPOSITION OF SEAWATER AND THE BLOOD SERUM OF THE *Callinectes danae* SMITH.

Methods are described for the micro-estimation of sodium, potassium, calcium, magnesium and phosphate in sea-water and the body-fluids of marine animals.

Sodium was isolated as the triple salt sodium — uranyl-magnesium acetate, and the color obtained by the interaction of potassium ferrocyanide and uranyl was measured in the Zeiss-Pulfrich step-photometer by employing filter S-43.

Potassium was precipitated as the potassium-silver-cobaltinitrite and determined indirectly by measuring photometrically the color given by cobalt with dimethylglyoxime and benzidine, according to the method described by Salomé Pereira (11).

Calcium was separated as the oxalate, transformed into the phosphate and determined photometrically.

Magnesium was isolated as the oxinate and the color obtained by coupling the oxine with diazotized naphthionic acid to a permanganate colored dye was measured in the Zeiss-Pulfrich step-photometer.

Phosphate is determined according to the method of Salomé Pereira described in 1939 (16).

Analysis of sea-water and blood serum of *Callinectes danae* Smith were made, and solutions for perfusing this decapod are proposed based on the results thus obtained. The results are given by Sawaya in this Boletim. (see p. 16). Tables are given.

#### B I B L I O G R A F I A

- 1) SALOMÉ PEREIRA, R. 1944. — Sobre a composição mineral do sangue do *Callinectes danae* Smith e sobre a de um líquido para perfusão. — Bol. Fac. Fil. Ci. Let. Univ. S. Paulo, Zool. 8, pp. 147-149, S. Paulo.
- 2) SAWAYA, P. 1944. — Solução perfusora para *Callinectes danae* Smith. — Ibidem-Zool. 8, 151-162.
- 3) BARBER, H. K. & KOLTHOFF, I. M. 1928. — A specific reagent for the rapid gravimetric determination of sodium. — J. Am. Chem. Soc. 50, pp. 1625-1631.
- 4) Mc CANCE, R. A. & SHIPP, H. L. 1931. — The colorimetric determination of sodium. — Bioch. J. V. 25, pp. 449-456, London.
- 5) CALEY, E. R. & TOULK, C. W. 1929. — A gravimetric method for the direct determination of sodium. — J. Am. Chem. Soc. V. 51, pp. 1664-1674.
- 6) KAHANE, M. E. & DUMONT, M. R. 1932. — Dosage du sodium dans les substances biologiques. — Bul. Soc. Chim. Biolog., V. 14, pp. 1257-1271, Paris.
- 7) PIPER, C. S. 1932. — The determination of sodium by precipitation as the triple salt sodium-uranyl-magnesium acetate. — J. Agricult. Sci., V. 22, pp. 675-687.
- 8) BARRENSCHEEN, H. K. & MESSINER, L. 1927. — Eine colorimetrische Mikrobestimmung des Natriums. — Bioch. Zeitschr., V. 189, pp. 308-313, Berlin.
- 9) ROBERTSON, J. D. & WEBB, D. A. 1939. — The micro-estimation of sodium, potassium, calcium, magnesium, chloride, and sulphate in sea-water and the body fluids of marine animals. — J. Exp. Biology, V. 16, pp. 155-177, Cambridge.
- 10) MARENZI, A. D. 1941 — Fotometria y su aplicacion al análisis biológico — pp. 157-159 — "El Ateneo", Buenos Aires.
- 11) SALOMÉ PEREIRA, R. 1945. — Photometric determination of potassium in biological materials. — J. Biol. Chem. — V. 160, n.º 2, pp. 617-629 — Baltimore.
- 12) SENDROY, J. 1944. — Determination of serum calcium by precipitation with oxalate. — J. Biol. Chem. V. 152, pp. 539-556, Baltimore.
- 13) I. M. KOLTHOFF & E. B. SANDELL. — Text-book of quantitative inorganic analysis. — pags. 345 e seguintes. MacMillan, New York 1943.
- 14) SALOMÉ PEREIRA, R. 1945. — Sobre a determinação de pequenas quantidades de cálcio. — Rev. Fac. Med. Veterinária (Univ. de São Paulo). No prélo.
- 15) SALOMÉ PEREIRA, R. 1945. — Sobre a determinação fotométrica do magnésio nos produtos de origem biológica. — Rev. Fac. Med. Veterinária (Univ. de São Paulo). No prélo.
- 16) SALOMÉ PEREIRA, R. 1939. — Sur la détermination spectrophotométrique de l'acide phosphorique au moyen de la réaction ceruleo-molybdique de Denigès. — Bul. Soc. Chim. Biol. — V. 21, f. 20 - pp. 827-835. Paris.

Trabalho realizado no Laboratório de Fisiologia Geral e Animal — Departamento de Zoologia, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. — Universidade de São Paulo — e no Departamento de Zoologia Médica e Parasitologia, da Faculdade de Medicina Veterinária — Universidade de São Paulo.



Consumo de oxigênio, em diferentes tensões,  
por *Trichodactylus petropolitanus* Goeldi  
(Crustacea, Brachyura)

por  
DOMINGOS VALENTE

2.o Assistente

Í N D I C E

1 — Introdução .....	pg. 87
2 — Métodos de trabalho .....	89
3 — Parte experimental — Consumo do oxigênio por <i>Tr.petalopolitanus</i>	
a) Influência das tensões médias .....	89
b) Influência das tensões baixas .....	90
c) Influência das tensões altas .....	92
d) Reversão de oxigênio pelos <i>Trichodactylus</i> .....	92
4 — Discussão .....	93
5 — Summary .....	96
6 — Bibliografia .....	97

1 — Introdução

Os estudos realizados sobre o comportamento dos Crustáceos Decápodos em relação ao consumo do oxigênio sob diferentes tensões na água, indicam a falta de um ponto de vista uniforme por parte dos diversos autores que se ocuparam do assunto. Assim é que *Scyllarus latus* e *Carcinus maenas*, segundo Henze (1910, p. 265), respiram independentemente da saturação do oxigênio na água. Amberson, Mayerson e Scott (1924, p. 173) verificaram que *Homarus americanus* e *Callinectes sapidus*, ao contrário, apresentam estreita dependência do consumo do oxigênio do teor do gás na água. Os mesmos autores nas suas experiências com *Palaemonetes vulgaris* notaram comportamento diferente, pois esses Crustáceos são capazes de regular o metabolismo abaixo de 50 % de saturação, o que quer dizer, até esse limite o consumo de oxigênio pelo animal independe da saturação. Outros são os resultados de Moore, Edie, Whitley e Dakin (1912, p. 286) relativamente a *Cancer* e a *Eupagurus*, que apresentam uma independência da referida tensão. A este respeito são dignas de observações as referências de Hyman que, em uma boa "mise-au-point" do assunto (1929, p. 507), põe dúvidas sobre os resultados de Moore et al. por se ter exaurido o oxigênio na água muito

antes da terminação da experiência com aquêles animais. Até aqui o material de experimentação restringiu-se, preferentemente, aos crustáceos marinhos.

A questão, porém, não é menos complexa quando se trata dos representantes que habitam a água doce. Assim, *Astacus fluviatilis* parece diminuir o consumo de oxigênio à medida que declina a saturação do gás na água, conforme as verificações de Brunow (1911, p. 215). Estas experiências foram retomadas por Héé e Bonnet (1925, p. 279) que estudaram o consumo de oxigênio por *A. fluviatilis* em concentrações que variaram de 5 a 22 cm<sup>3</sup> de oxigênio por litro d'água e determinaram ser constante o consumo do gás entre 5 e 8 cm<sup>3</sup>, mas tal consumo aumentava à medida que os animais dispunham de concentrações mais elevadas. Ainda o comportamento de um dos Macruros mais comuns d'água doce nos Estados Unidos (*Cambarus immunis*) foi exaustivamente estudado por Helff (1928) quanto ao consumo de oxigênio por animais isolados e em grupo. Pelas conclusões de Helff vê-se que o gasto de oxigênio pelo *Cambarus* independe da tensão até 20 %-40 % de saturação e que a capacidade respiratória é tanto menor quanto mais idoso for o animal. Outro ponto apenas abordado de passagem pelo autor é o referente à particularidade do *Cambarus* reverter oxigênio para o ambiente, quando a saturação é demasiado baixa. Trabalhos mais recentes, ainda sobre Crustáceos de água doce, são os de Kalmus (1930) e de Segaar (1935) com *Potamobius (Astacus) fluviatilis*. Para o primeiro destes autores, a respiração do Macruro, em limites bastante extensos, independe da tensão do oxigênio do meio. Haveria aqui notável influência do estado de repouso ou de movimento do animal, pois que o consumo de oxigênio se eleva de 60 % quando o animal se põe em movimento. No jejum, dá-se o contrário, o animal diminui o consumo do gás. Os estudos de Segaar, bastante completos sobre a respiração do mesmo Macruro, demonstraram que numa saturação muito baixa há uma inibição homolateral reflexa da respiração, e, em consequência, ocorre apnéa quando a tensão desce abaixo da normal.

Em todos os trabalhos acima mencionados o método da dosagem do oxigênio foi o de Winkler e suas modificações, sendo que as alterações da técnica se basearam, principalmente, em manter os animais em meio líquido circulante ou estacionário.

Pelos resultados acima sumariados nota-se que a questão do comportamento dos Crustáceos Decápodos em relação às tensões de oxigênio no meio em que respiram, está longe de ser resolvida. A bibliografia aqui aludida e que foi aquela ao meu alcance nas condições atuais, deixa entrever que, nos representantes marinhos desta classe de Artrópodos, parece haver uma tendência para independer o consumo de oxigênio da saturação do meio ambiente.

Nos Crustáceos de água doce os dados fornecidos pelos vários autores não levam a conclusões definitivas. Confrontando os resultados até agora conhecidos, pode-se dizer que nesses Decápodos há um certo grau de independência do consumo de oxigênio em relação à saturação da água. À vista disso, pareceu-me de importância êsse estudo nas regiões tropicais, onde a pobreza de oxigênio é um dos caraterísticos das águas dos lagos e dos poços frequentados por uma fauna numerosa e bastante variada. Assim, segui a sugestão do Prof. Dr. Paulo Sawaya de estudar a influência da tensão do oxigênio sobre a respiração de um dos Braquiúros mais frequentes nas lagoas e correços dos arredores de São Paulo, o *Trichodactylus petropolitanus* Goeldi,

baseada no comportamento dos animais em relação ao consumo de oxigênio e à saturação da água ambiente. Além de ser material muito favorável para a tais pesquisas, apresenta o *Tr. petropolitanus* a particularidade de poder manter-se horas fora d'água, o que está a indicar contextura especial de seus sistema respiratório e, portanto, mecanismo regulador especializado. Possivelmente, como aponta Carter (1931, p. 16), o *Trichodactylus* poderá ser incluído entre os Crustáceos de respiração aérea, o que em parte concorda com as observações de Lüderwaldt (1919, p. 384), que os cataloga entre os habitantes dos manguesais. Estes animais já foram objeto de pesquisas anteriores em que pude demonstrar (Valente, 1943 p. 306) sensível diminuição do consumo do oxigênio quando mantidos em grupo.

A seguir, como se verá, os resultados obtidos permitem localizar êstes Braquiúros entre os animais cujo metabolismo depende, até certo ponto, das condições de saturação do oxigênio da água em que o animal respira.

## 2. Métodos de trabalho.

Os animais eram pescados com armadilhas no rio Tieté e seus afluentes nos arredores de S. Paulo e conduzidos para o laboratório onde estacionavam em aquários com água corrente da torneira. Depois de alguns dias eram transferidos para aquários de vidro de capacidade de 3.000-5.000 cm<sup>3</sup> com água destilada. Antes de colocá-los nos aquários, era determinada a percentagem de saturação da água correspondente. Mantidos os aquários nos laboratórios, no sub-solo, onde a temperatura não variava mais que 2°C, verificou-se que o limite de saturação de oxigênio da água destilada permanecia entre 50-70 % a 19°-20°C. Para se obterem saturações mais elevadas, os aquários eram insuflados com oxigênio puro, conseguindo-se assim até o máximo de 222,2% de saturação. Algumas vezes a insuflação foi feita com ar e, nêstes casos, as saturações ficavam ao redor de 90 %. Para as saturações abaixo de 50 % foi empregado o método de deixar os animais durante horas dentro do aquário cuja superfície era recoberta por uma camada de 5 cms. de espessura de óleo de parafina, segundo a técnica indicada por Helff (1928, p. 79). Desta maneira, foram conseguidas saturações até o mínimo de 29,5 %.

A ordem das pesquisas foi sempre a seguinte: primeiramente se determinava a percentagem de saturação da água, depois os *Tr.* eram previamente pesados e colocados um em cada aquário com a superfície líquida protegida por uma camada de 5 cms. de altura com óleo de parafina. A seguir, de hora em hora, geralmente a partir das 8 hs. a.m., eram feitas as demais determinações pelo método de Winkler modificado por Birge e Juday (1911, p. 13). Retiraram-se de cada vez 30-50 cm<sup>3</sup> de água para as dosagens. Por via de regra, logo que tocava o fundo do aquário, o animal aí ficava imobilizado e assim permanecia durante todo o tempo das experiências. Geralmente, os animais experimentados haviam passado pelo menos 24 horas em jejum. Nenhum caso de muda ocorreu durante as experiências. Outros pormenores da técnica serão referidos na parte experimental correspondente.

A percentagem de saturação foi determinada pela fórmula de Birge e Juday. A fim de evitar o uso do agitador d'água, vali-me do método recomendado por Sawaya (1945) que consiste em usar um sifão de vidro com a haste que mergulha no aquário perfurada em várias alturas. Com isto, obtem-se água de vários extratos durante a sintonagem.

## 3. Parte experimental: Consumo de oxigênio por *Tr. petropolitanus*.

### a) Influência das tensões médias.

Exemplares de *Tr. petropolitanus* de pêsos compreendidos entre 7-11 gr. foram submetidos a diferentes percentagens de saturação, sendo de 50% o valor mínimo e 68,9% o máximo iniciais nesta série de experiências. O valor mais baixo atingido foi de 43,3% nesta série de pesquisas. A maior variação de tensão entre duas horas consecutivas foi de 7,3% (exp. n. 2). A

média dessa variação foi, porém, de 4% quando comparadas as tensões da primeira e da segunda hora e de 2,3% entre a da segunda e da terceira hora. Ao cabo de cada hora, não foi renovada a água do aquário, de modo que, em virtude do metabolismo do animal, a tensão do oxigênio abaixou gradativamente. Os resultados acham-se expressos na tabela I.

TABELA I

Variação no consumo de oxigênio de *Trichodactylus petropolitamus* submetidos a tensão inicial média.

(Valores reduzidos a 0°C e 760 mm de Hg)

Experiência N.º	Animal		1.ª hora		2.ª hora		3.ª hora	
	Sexo	(gr.) Peso	tensão (%)	consumo (cm³/1/h)	tensão (%)	consumo (cm³/1/h)	tensão (%)	consumo (cm³/1/h)
1	fem.	7,0	63,4	0,208	60,0	0,144	57,6	—
2	fem.	9,0	60,0	0,471	52,7	0,164	50,3	—
3	fem.	9,0	67,0	0,147	64,6	0,190	61,6	0,081
4	fem.	9,0	50,7	0,251	46,7	0,168	44,0	0,084
5	fem.	10,0	52,7	0,384	46,7	0,163	44,4	—
6	fem.	10,0	66,1	0,147	63,7	0,076	62,5	0,120
7	fem.	10,0	52,0	0,316	47,0	0,247	43,3	—
8	fem.	10,0	66,3	0,152	63,9	0,197	60,8	0,123
9	masc.	10,5	56,4	0,084	55,1	0,180	52,4	—
10	masc.	10,5	68,9	0,161	66,3	0,250	62,2	0,086
11	fem.	11,0	59,4	0,451	52,3	0,101	51,1	—
12	fem.	11,0	68,3	0,204	64,0	0,089	62,7	0,185
Média				0,253		0,164		0,113

Como decorre do exame dessa tabela, os *Tr.* nas condições experimentais mencionadas, consumiram mais oxigênio na primeira hora. Esse consumo decresceu sucessivamente nas horas subseqüentes (em média: 0,253 na 1.ª, 0,164 e 0,113 na 2.ª e 3.ª hora). Embora a variação das tensões iniciais não tivesse sido excessiva, entre 50,7% e 68,9%, a quantidade de oxigênio consumida pelos animais variou em maior extensão, de 0,084 e 0,471 na 1.ª hora. Essa variação não pode correr por conta do pêso, porquanto todos os animais da experiência apresentaram pêsos próximos. Na 2.ª e na 3.ª hora o mesmo fenômeno se observa, pois que as tensões oscilaram entre 46,7% e 66,3% (2.ª hora) e entre 43,3% e 62,7% (3.ª hora), e os consumos variaram respectivamente entre 0,076 e 0,250 (2.ª hora) e 0,081 e 0,185 (3.ª hora). Nota-se ainda mais que, ao cabo da 2.ª hora, houve uma variação menor no consumo do oxigênio (0,250-0,076) ou sejam 16,4% em oposição a 25,3% do consumo da 1.ª hora. Essa variação foi ainda menor na 3.ª hora (0,185-0,081) correspondendo a 11,3%.

Com exceção do *Tr.* da experiência n. 4, em que o consumo do oxigênio foi decrescendo da 1.ª para a 3.ª hora, nas demais sempre houve uma alternância no consumo, i.é, a um menor gasto de oxigênio seguiu-se um gasto maior, seja da 1.ª para a 2.ª ou desta para a 3.ª hora, e vice-versa, embora as saturações correspondentes tenham crescido continuamente.

#### b) Influências das tensões baixas.

Nesta série de experiências os animais foram submetidos, logo de início, a tensões baixas, obtidas segundo a indicação da p. 89. Uma vez determi-

nadas as concentrações iniciais do oxigênio na água, aqui considerada como de tensão baixa (entre 48,8% e 29,4%), o crustáceo era aí colocado e a seguir, em horas consecutivas, faziam-se as determinações. A temperatura oscilou entre 19-20°C. Foram usados animais de 10-12 gr. A maior variação de tensão entre duas horas consecutivas foi de 4%. Em média, entre a 1.a e a 2.a hora houve uma variação de 3,1% e de 2,2% entre a 2.a e a 3.a, e entre esta e a 4.a hora, respectivamente. Foram registrados nesta parte do trabalho quatro casos de reversão de oxigênio pelos animais, fato que será objeto de estudo mais adiante (p. 92). A tabela II dá conta dos resultados.

TABELA II

Variação no consumo do oxigênio de *Trichodactylus petropolitanus* submetidos a tensão inicial baixa.

(Valores reduzidos a 0°C e 760 mm de Hg)

Expe- riência N.º	Animal		1.a hora		2.a hora		3.a hora		4.a hora	
	Sexo	Peso (gr.)	tensão (%)	consumo (cm <sup>3</sup> /1/h)	tensão (%)	consumo (cm <sup>3</sup> /1/h)	tensão (%)	consumo (cm <sup>3</sup> /1/h)	tensão (%)	consumo (cm <sup>3</sup> /1/h)
13	fem.	10,0	47,3	0,136	45,1	0,225	41,5	0,090	40,1	—
14	fem.	10,0	39,6	0,197	36,2	0,079	35,2	0,090	33,9	—
15	masc.	10,5	39,6	0,191	36,6	0,077	35,3	0,153	32,9	—
16	fem.	11,0	48,8	0,230	45,0	0,153	42,6	0,248	38,6	—
17	fem.	12,0	35,8	0,336 <sub>y</sub>	41,0 <sub>x</sub>	0,166 <sub>y</sub>	43,6 <sub>x</sub>	—	—	—
18	fem.	12,0	30,7	0,096 <sub>y</sub>	32,2 <sub>x</sub>	0,171	29,4	0,113 <sub>y</sub>	31,3 <sub>x</sub>	—
Média				0,188		0,141		0,114		—

x — casos de reversão de oxigênio.

y — valores que, por serem de casos de reversão, não foram computados para o cálculo das médias.

Como se vê, também a partir de baixas tensões, a média dos consumos de oxigênio continuou decrescente desde a primeira hora (0,188-0,141-0,114). No cômputo das médias não foram, naturalmente, levados em conta os casos de reversão que constam da tabela. A variação das tensões foi de 30,7% a 48,8%, e o consumo do oxigênio pelos *Tr.*, excetuados os casos de reversão, manteve-se entre 0,136 a 0,230 na primeira hora. Como nas tensões médias, o peso aqui também não exerce influência. Na 2.a hora, as tensões mantiveram-se entre 36,2% e 45,1% e o consumo entre 0,077 a 0,225. Finalmente, na 3.a hora, para uma variação de 35,2% a 42,6% nas tensões, correspondeu uma do consumo entre 0,090 a 0,248. Tanto quanto é possível deduzir da tabela, os animais demonstram ter capacidade de regulação respiratória, porquanto, em todos os casos, exceto os de reversão, não diminuíram, senão nos valores médios, o consumo com o abaixamento progressivo da tensão e ofereceram valores para o consumo bastante variados.

Tal como aconteceu com os *Tr.* submetidos a tensões entre 50,7% e 68,9% (tab. I) aqui também se nota a alternância no consumo de oxigênio, i. é, a um menor gasto segue-se às vezes um maior consumo e vice-versa. Este fenômeno é, no caso presente, mais acentuado que nos da tab. I.

## c) Influência das tensões altas.

Os *Tr.* foram sujeitos a tensões desde 76,1% a 222,2% de saturação. A temperatura manteve-se entre 15,5°-25,2°C. Os animais pesavam entre 7-12,4 gr. Cumpre notar que os aquários nesta série estiveram no laboratório, onde a variação da temperatura foi sensível, o que não ocorreu no quarto do sub-solo, como nas experiências anteriores.

TABELA III

Variação no consumo de oxigênio de *Trichodactylus petropolitanus* submetidos a tensão inicial alta.

(Tensões expressas em percento de saturação e consumo em cm<sup>3</sup>/1/h reds. a 0°C e 760 mm Hg)

Expe- riência N.º	Animal		1.ª hora		2.ª hora		3.ª hora		4.ª hora		5.ª hora		6.ª hora	
	Sexo	Peso (gr.)	tensão	consumo										
19	fem.	7,0	197,5	0,160	196,7	0,460	187,5	0,000	187,5	—	—	—	—	—
20	ind.	8,0	100,2	0,330	96,7	0,430	91,0	—	—	—	—	—	—	—
21	ind.	8,0	222,2	1,550	—	—	176,5	1,570x	170,1	0,650	163,3	0,910	152,5	0,610
22	ind.	11,8	126,7	0,540	121,8	0,370	112,0	—	—	—	—	—	—	—
23	ind.	11,8	91,5	0,520	84,0	0,610	74,7	—	—	—	—	—	—	—
24	ind.	12,4	87,8	1,810	59,3	0,480	52,5	—	—	—	—	—	—	—
25	ind.	12,4	76,1	0,440	68,6	0,210	66,9	—	—	—	—	—	—	—
Média			0,764		0,426		—		—		—		—	

x = consumo referente a duas horas.

Analisando-se os dados da tabela, nos casos em que foi possível calcular a média, é patente que também aqui, o consumo foi maior na primeira hora que na subsequente. De um modo geral, o consumo considerado pelos valores médios, embora notavelmente mais alto do que nos casos de concentrações médias, não está condicionado às tensões, quando analisado isoladamente, sendo inúmeros aqueles em que numa tensão mais baixa o consumo foi mais elevado. O maior consumo verificado (1,810) não correspondeu à maior tensão. O que mais ressalta do exame da tabela III é o fato de o consumo médio, em altas tensões, ser quase de 3,5 vezes maior do que em tensões médias e de 4 vezes maior do que o das baixas tensões.

Somente no único caso em que foi feita a dosagem durante sete horas consecutivas é que se pode distinguir uma alternância no consumo, tal como já foi indicado nas dosagens das experiências antecedentes.

d) Reversão de oxigênio por "*Trichodactylus*" em baixas tensões.

Em quatro casos, todos referentes a um mesmo animal, foram registradas reversões de oxigênio ao meio ambiente. Pelo termo reversão indico, seguindo a Helff (1. c., p. 94), os casos de, na determinação do consumo do oxigênio pelo *Tr.*, encontrar maior quantidade de oxigênio na água que na determinação antecedente.

TABELA IV

Reversão de oxigênio por *Trichodactylus petropolitanus* sob diferentes tensões.

(Valores reduzidos a 0°C e 760 mm de Hg)

Expe- riência N.º	Animal		Data	Dur. da exper. (em horas)		Temper. água (em °C)		Tensões (%)		Aumento de oxigênio (cm <sup>3</sup> /litro)
	Sexo	Peso		Início	Fim	Inicial	Final	Inicial	Final	
17	fem.	12,0	5.3.45	9,00	10,00	19,5	19,5	35,8	41,0	0,336
17	fem.	12,0	5.3.45	10,00	11,00	19,5	19,5	41,0	43,6	0,168
18	fem.	12,0	6.3.45	8,40	9,40	19,0	19,0	30,7	32,2	0,096
18	fem.	12,0	6.3.45	10,40	11,40	19,0	19,0	29,4	31,3	0,113

Pelos dados da tabela vê-se que a maior reversão não corresponde à menor tensão inicial da experiência. Importante, contudo, é frisar que os casos de reversão se passaram todos com o mesmo animal, em baixas tensões e ocorreram em sucessão cronológica (exp. n. 17 e 18).

#### 4. Discussão.

Pelos resultados das experiências realizadas, nota-se que *Tr. petropolitanus* quando submetido às tensões altas, médias e baixas de oxigênio, apresenta comportamento que varia de acordo com o teor da saturação do gás na água.

Nas tensões médias a variação do consumo foi de tal ordem em relação às percentagens de saturação do oxigênio na água, que se pode dizer que o consumo de oxigênio, em tais condições, independe, sob certos aspectos, das tensões. Todavia, os dados das experiências indicam que os *Tr.*, em geral, diminuem, quando se levam em conta apenas os valores médios, o consumo do oxigênio da primeira para a terceira hora, não obstante haver casos de maior consumo na segunda. Digno de nota, quando se consideram os casos isoladamente, é a verificação da alternância do consumo, quer dizer, a um consumo mais baixo numa determinada hora segue sempre um mais alto e vice-versa. Tais fenômenos são indicativos de uma capacidade de regulação respiratória por parte dos *Tr.* Os mesmos fenômenos são observáveis quando os animais se encontram em meio de baixas tensões de oxigênio. Nesses casos, porém, o decréscimo do consumo do oxigênio é mais uniforme, como se vê pela comparação dos dados das tabelas I e II. A tensão mais baixa de oxigênio conseguida foi de 29,4%, a qual se revelou insuficiente para determinar a perda da capacidade regulatória, e subsequente asfixia do animal. Talvez esse fato corra por conta da capacidade excepcional que o *Tr.* apresenta de reverter o oxigênio ao meio ambiente. Não me foi possível, nesta série de experiências, obter tensões inferiores a 29,4% a fim de determinar o limite inicial daquela reversão.

Quanto às tensões altas, os *Tr.*, em geral, aumentam o consumo do oxigênio com o aumento das tensões. Porém, tal aumento não se dá integralmente proporcional às tensões, pois que é bastante variável, havendo mesmo

casos de, em tensões menores, dar-se um consumo maior. Na média, todavia, pode-se dizer, à vista dos dados da tabela III, que o consumo correspondente é cerca de 3,5 vezes mais que nas condições das tensões da tabela I. Isto se verifica, devo acentuar, para a primeira hora em que, também aqui nas altas tensões, o consumo é sempre maior. Pela tabela III nota-se que nas condições de supersaturação o consumo de oxigênio é bastante elevado, o que estaria a indicar uma certa dependência da tensão. Não resta dúvida, se compararmos os dados das três tabelas no seu conjunto, que os *Tr.*, à medida que dispõem de maior quantidade de oxigênio gastam mais o gás, e, vice-versa, quando o meio ambiente se empobrece desse gás os animais restringem o seu consumo, até o limite de, para equilibrarem as tensões, os *Tr.* emitirem o oxigênio de reserva. Isto quer dizer que, embora haja variação do consumo nas diversas tensões do gás na água, ocorre um certo ritmo de consumo do gás pelo animal. Com a designação de ritmo de consumo desejo indicar o fenômeno que se percebe muito bem quando, à vista dos valores médios em cada hora o consumo vai crescendo à medida que as tensões vão aumentando, isto é, maior quantidade de oxigênio é posta à disposição do animal. Em virtude, porém, da não correspondência absoluta entre o consumo de oxigênio e as tensões em cada uma das séries de tensões (baixas, médias e altas) tal dependência é apenas parcial. Tenho para mim que este fenômeno se explica pela capacidade que os *Tr.* possuem de regular o consumo do oxigênio. Tanto assim que, quando as tensões são muito baixas, os *Tr.* procuram restabelecer o equilíbrio ao mesmo tempo diminuindo o consumo e revertendo o oxigênio para o meio ambiente.

A reversão do oxigênio nos Crustáceos foi assinalada por Helff (1928, p. 94) em *Cambarus immunis* ao notar a libertação de oxigênio na água do animal, quando as tensões do gás eram muito baixas. Helff atribui o fenômeno à possibilidade de uma perda temporária ao poder das células de reterem uma reserva suplementar de oxigênio. Acentua que, uma vez surgida a reversão num animal, há maiores possibilidades de ela aparecer novamente, em especial quando se inicia a asfixia. Não posso dizer que a sugestão de Helff não seja aceita para o Crustáceo objeto de suas investigações. Aqui, porém, em *Trichodactylus*, parece-me que a reversão não se dá por uma perda temporária do poder de retenção do oxigênio pelas células do corpo, mas a meu vêr, o fato destes Braquiúros serem capazes de respiração aérea, está a indicar talvez uma possibilidade de manterem, na câmara branquial, ar de reserva, o qual seria expulso no instante necessário quando o desequilíbrio se estabelecesse por causa das tensões baixas. Penso que assim se explicaria o fato de encontrar-se, num determinado momento, maior quantidade de oxigênio, que na dosagem antecedente. E' possível também que existam em *Tr. petropolitanus* os lagos sanguíneos abaixo do epitélio vascular da câmara branquial, tal como Carter (1931, p. 16), em rápida nota, assinala em *Tr. orbicularis*. Se assim for, a hipótese de ser o oxigênio liberto da massa do sangue quando as tensões decrescem, deverá ser também lembrada, uma vez que este fato não é raro ocorrer nos Crustáceos, como bem o demonstrou Segaar (1935, p. 502) em *Astacus fluviatilis*. Diz este autor que o fenômeno está relacionado com o que chama inibição homolateral reflexa da respiração, i.é, o mecanismo de ventilação diminui ou cessa os seus movimentos quando a tensão decresce abaixo de certo nível, tanto no meio externo como no interno (interior do animal, portanto o sangue).

Embora seja o meu material bastante diferente do de Helff, a semelhança dos métodos adotados e os resultados obtidos podem permitir um confronto visto como, em algumas vezes, me foi possível confirmar as deduções desse autor. Assim é que, tanto *Tr. petropolitanus* como *C. immunis* respiram mais na primeira hora que na segunda e mais nesta que na terceira, isto se se levarem em conta apenas os valores médios obtidos (v. tabelas I, II, III). Helff atribui este fato ao aumento de temperatura cada vez maior da água nas horas sucessivas. No meu caso, porém, tendo trabalhado, quase sempre, em ambiente em que a temperatura apenas variava de 1-2° durante todo o curso das experienciências, não é possível dar essa interpretação ao fenômeno. Quero crer se deva antes levá-lo à conta do fato de passarem os animais da água corrente da torneira para a água destilada. Seria possível também responsabilizar o fenômeno por uma influência de pH, pois que em geral a água da torneira tinha um pH por volta de 8, enquanto que a água destilada o apresentava entre 6 e 6,5. Além disso, julgo que o fato de, na primeira hora, os *Tr.* terem à sua disposição maior quantidade de oxigênio, não é sem importância para a explicação do referido fenômeno. Ainda mais, Helff julga que o peso dos *Cambarus* tem influência no consumo do oxigênio, pois os animais mais velhos, portanto mais pesados, são menos capazes de regular a respiração. O mesmo não posso afirmar quanto ao *Tr.*, visto como nenhum efeito observei quanto ao peso dos animais, com referência à capacidade de regulação.

Das experienciências efetuadas decorre a verificação de possuírem os *Tr.* uma capacidade de regulação da respiração. Quanto ao mecanismo regulador, sua identificação exige outras experienciências que ainda não me foi possível realizar. Lembro apenas que para Segaar (1. c.) a regulação respiratória de *Astacus fluviatilis* é um fenômeno reflexo dependente das tensões baixas dos meios interno (do animal) e externo, e da ventilação pelo escafnognatito. No meio interno do animal tanto Segaar (1. c.) como Kalmus (1930, p. 755) assinalam a hemocianina como elemento de importância para a regulação respiratória.

Finalmente, os resultados agora conseguidos com *Tr. petropolitanus* submetidos às diferentes tensões de oxigênio, podem ser assim sumariados:

1. Quando *Tr. petropolitanus* é submetido em ambiente confinado a diferentes percentagens iniciais de saturação do oxigênio na água, o consumo do gás durante a primeira hora é sempre maior, em média, que os das horas subseqüentes.
2. Em certos casos ocorre uma alternância no consumo do oxigênio, a saber, ao maior consumo segue-se um abaixamento, e a este novamente um aumento do consumo.
3. Dentro dos limites estabelecidos para as tensões chamados altas, médias e baixas, o consumo do oxigênio por *Tr. petropolitanus* é bastante variável, mas, tomando-se como referência o consumo médio dentro de uma mesma série de tensões, os *Tr.* mostram evidente dependência parcial do consumo da tensão do oxigênio do meio ambiente.
4. *Tr. petropolitanus* apresenta o fenômeno chamado da reversão do oxigênio, i. é, quando as tensões do oxigênio decrescem acentuadamente (em torno de 30% de saturação) o animal expulsa oxigênio do corpo, na ten-

tativa de restabelecer a tensão mínima necessária para possibilitar a respiração.

5. O fenômeno da reversão é discutido no presente trabalho.
6. Os pesos dos animais não influem sobre o consumo do oxigênio.

### 5. Summary

## THE EFFECT OF OXYGEN TENSION ON OXIGEN CONSUMPTION IN *Trichodactylus petropolitanus* GOELDI (Crustacea, Brachyura)

The relation of oxygen consumption to oxygen tension has been determined in *Trichodactylus petropolitanus* Goeldi, the common water crayfish living in the streams of the outskirts of S. Paulo.

The animals were collected and brought to the laboratory where they spend from two to four days before the beginning of the experiments.

Oxygen consumption per hour was determined by the Birge and Juday's (1911) modification of the Winkler method. Only single animals were tested. 3.000 - 5.000 cm<sup>3</sup> glass jars were filled with distilled water and the surface protected with 5 cm high column of vaseline oil. Suitable outlet tubes were employed as indicated by Sawaya (1945). Several jars have been placed in the laboratory-room where the variation of the temperature did not vary more than 2°C.

The high oxygen tensions were obtained by insufflation of pure oxygen into the water. To secure water of low oxygen tension Helff's method (1928, p. 79) was employed. The oxygen tensions between 76,1 to 222,2; 50,7 to 68,3 and 47,3 to 29,4 were considered high, moderate and low tension respectively.

The experiments were usually started at 8:00 a.m., and the oxygen consumption determinations were made at the end of each hour thereafter. The samples were drawn from the flasks and immediately titrated to avoid possible errors due to standing. For the titration 30-40 cm<sup>3</sup> samples were drawn each hour. The water drawn was not replaced by water of any tension. In this way the oxygen tension lowered at each hour.

When placed into the jars filled with distilled water *Tr.* remained inactive at the bottom during all the time of the experiments. *Tr.* are very sensitive to light, so the jars were placed into an under-ground room where deam light and constant temperature were favourable to the animals. These were weighed before each series of experiments. The oxygen consumption was calculated in cm<sup>3</sup>/liter/hour.

In a previous work (Valente 1943, p. 306) it was stated that the animals show considerable variation of the oxygen consumption.

No case of moult was observed during the course of these experiments.

The results from three series of tests, with *Tr. petropolitanus* submitted to high (Table III) moderate (Table I) and low tensions (Table II) may be summarised as following:

1. The oxygen consumption of *Trichodactylus petropolitanus* has been studied at different oxygen tensions. For the majority of tested animals the

amount of oxygen consumption during the first hour is greater than that consumed during the following hours. The average computed of the oxygen consumption of the first hour is allways greater than in the following.

2. In some cases there is relatively high and low amounts of oxygen consumption on alternate hours.

3. The variation in oxygen consumption of animals tested hourly in water of each series of experiment of determined oxygen tension is very high. However, as an average, in the same series the variation of oxigen consumption indicated that *Tr.* is not entirely independent of the oxygen tensions.

4. In four cases *Tr.* submitted at low oxygen tensions (about 30%) appeared pratically to stop respiration, and the tests for such periods indicated and increase of the oxygen of the water, presumably released by the animal. This phenomenon is called reversal of oxygen and it is presumed that *Tr.* adds oxygen to the water, probably in order to re-establish the oxygen tension.

5. The reversal of oxygen to water by *Tr.* seems due to some peculiarities of the respiratory system of this crayfish. *Tr. petropolitanus* lives in waters of low oxygen tensions and is able to remain out of water during a period of 24 hours, more or less.

6. Weight and age of *Tr.* have no influence on variation of oxygen consumption.

#### B I B L I O G R A F I A.

- 1 — AMBERSON, W. R., Mayerson, H. S. & Scott, W. J. — (1924-25) — The influence of oxygen tension upon the metabolic rate in Invertebrates. — Jour. Gen. Physiol., v. 7, pp. 171-176. New York.
- 2 — BIRGE, E. & Juday, C. (1911) — The inland lakes of Wisconsin. — Wiscons. Geol. & Nat. Hist. Surv. Bull. v. 22, Ser. Scient. n. 7, 250 pp. Madison.
- 3 — BRUNOW, H. (1911) — Der Hungerstoffwechsel des Flusskrebsses. — Zeitsch. f. allg. Physiol., v. 12, pp. 215-276. Berlim.
- 4 — CARTER, G. S. (1931) — Aquatic and aerial respiration in animals. — Biol. Rev., v. 6, n. 1, pp. 1-35. Cambridge.
- 5 — HÉE, A. & Bonnet, R. (1925) — Influence de la teneur en oxygène du milieu sur l'intensité respiratoire des animaux poikilothermes et des végétaux. — Arch. Internat. Physiol., v. 25, pp. 279-290. Liège.
- 6 — HELFF, O. M. (1929) — The respiratory regulation of the crayfish, *Cambarus intumens*. — Physiol. Zool., v. 1, pp. 76-96. Chicago.
- 7 — HENZE, M. (1910) — Über den Einfluss des Sauerstoffdrucks auf den Gaswechsel einiger Meerestiere. — Biochem. Zeitsch., v. 26, pp. 255-278. Berlim.
- 8 — HYMAN, L. H. (1929) — The effect of oxygen tension on oxygen consumption in Planaria and some Echinoderms. — Physiol. Zool., v. 2, pp. 505-533. Chicago.
- 9 — KALMUS, H. (1930) — Untersuchungen über die Atmung des Flusskrebsses *Potamobius astacus* Leach. — Zeitschr. vergl. Physiol., v. 12, pp. 725-759. Berlim.
- 10 — LUEDERWALDT, H. (1919) — Os manguesaes de Santos. — Rev. Mus. Paul., v. 11, pp. 309-409. São Paulo.
- 11 — MOORE, B., Edie, E. S., Whitley, E. & Dakin, W. J. (1912) — The nutrition and metabolism of marine animals in relationship to (a) dissolved organic matter and (b) particulate organic matter of sea-water. — Biochem. Jour., v. 6, pp. 255-296. London.
- 12 — SAWAYA, P. (1945) — Eficácia da camada de oleos vegetais e minerais como agente de proteção contra o oxigênio do ar. — Bol. Fac. Fil., Ciênc. Letr., Zoologia 10, no prélo.
- 13 — SEGAAR, J. (1935) — Die Atmungsbewegungen von *Astacus fluviatilis*. — Zeitsch. vergl. Physiol., v. 21, pp. 492-515. Berlim.
- 14 — VALENTE, D. (1943) — O efeito de número sôbre o consumo de oxigênio por Crustáceos Decápodos. — Bol. Fac. Fil. Ciênc. Letr. Univ. S. Paulo, v. XXXII, Zool. n. 7, pp. 305-310. S. Paulo.



*INDUSTRIA GRAFICA  
JOSE MAGALHÃES LTDA  
Rua Quirino de Andrade, 59-67  
SÃO PAULO*

*O Departamento de Zoologia*

pede e agradece a remessa de suas publicações.  
vous prie de lui envoyer vos publications.  
shall be glad to receive your publications.  
le agradecerá el envío de sus publicaciones.

*Endereço:*

Departamento de Zoologia  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras  
Caixa Postal 105-B  
S. Paulo (Brasil).

