

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 soro 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 soro sanguíneo de 56 exemplares, sendo cada soro obtido de uma mistura de sangues de vários animais; 2. análise individual do soro 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 soro 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 soro 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 acordo com os resultados de todas as análises individuais, excetuadas as de 7 *Callinectes* que permaneceram, durante 16 horas na água doce.

Cumprir 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 Cl^- e 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 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 os 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 ele 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 contato 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 sobre 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-electrômetro 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 acerca 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 sobre as fibras cardíacas. A 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 I

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 ₂		MgCl ₂	
	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 acordo 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 cálcio. 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 cálcio, deu-se diminuição da frequência e aumento ligeiro da intensidade. Pouco depois verificou-se o inverso, repetindo estes 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 cálcio, as perturbações foram menos acentuadas, mas ainda assim bastante sensíveis. Logo depois de iniciada a perfusão houve marcado aumento da frequência e maior amplitude. Estes 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 ₂		MgCl ₂	
		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⁻ e SO₄⁻⁻ sobre o órgão. Como é sabido, tanto na água do mar onde vivem estes crustáceos, como no seu próprio sangue, alguns cationios estão unidos ao SO₄⁻⁻. Até o momento não foi possível fazer a determinação desse anião 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 acentua até a paralização completa em diástole, em cêrca 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 juntá-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 soro sanguíneo. Sais expressos em gramas por 100. M : molaridade.

Sol. n.	NaCl M		KCl M		CaCl ₂ M		MgCl M		MgSO ₄ 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	—	—	1.810	.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 cálcio (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 cálcio nesta solução por 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 deste 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 deste 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*.

Estes autores tiveram oportunidade (1. c., p. 46) de comparar os resultados obtidos com este 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 destes 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 acôrdo 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 sôro. E' 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 sôro sanguíneo do *Callinectes*, tomada em seus valores médios. Sem dúvida, quando se conhecer a quantidade do aniônio SO_4 no sôro sanguíneo dêsse Crustáceo, essa solução perfusora deverá ser completada ajuntando-se êsse 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 cêrca 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 êste 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 acentúa Prenant (1933, p. 113) não é tão simples como poderá parecer à primeira vista. Pelo contrário, é bem complexa e, porisso, 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 teôr iônico dos seus elementos quando comparados com o do sôro dêsse 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 dos 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 cálcio 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 ₂	MgCl ₂	MgSO ₄	NaHCO ₃
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 dispor 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 cálcio 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, CaCl₂ .013 M, MgCl₂ .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 SO₄ é tolerada durante cêrca de 2 horas.
5. O pH do sôro de *C. danae* varia entre 7,3 e 7,5.
6. Quando imerso na mixtura NaCl + CaCl₂ (.418 M & .013 M) pH 7,5, os batimentos do coração de *C. danae* prolongam-se até cêrca 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 Zood & 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 (1. 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)

SO₄ 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 SO₄ 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 SO₄ 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 (l. 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 sensitiveness 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 (1. 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 percent 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 1. 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 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 $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$ (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.

- Balazs, 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 soro 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 Crustáceo 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, It. 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. Zoond, 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 GRÁFICOS.

Perfusões do coração de *C. danae*.

- Fig. 1 — Solução 1 (NaCl .429; KCl .012; CaCl₂ .017; MgCl₂ .017). Tempo de perfusão 60 minutos.
- Fig. 2 — Solução 3 (NaCl .448; KCl .013; CaCl₂ .014; MgCl₂ .019). Tempo de perfusão 30 minutos.
- Fig. 3 — Solução 5 (NaCl .443; KCl .012; CaCl₂ .016; MgCl₂ .017). Tempo de perfusão 45 minutos.
- Fig. 4 — Solução 4 (NaCl .418; KCl .012; CaCl₂ .013; MgCl₂ .017). Tempo de perfusão 6,5 horas.
- Fig. 5 — Solução 2 (NaCl .429; KCl .012; CaCl₂ .017; MgSO₄ .016). Tempo de perfusão 30 minutos.
- Fig. 6 — Solução 6 (NaCl .418; KCl .012; CaCl₂ .013; MgCl₂ .016; MgSO₄ .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 (CaCl₂ .013). Tempo de perfusão 15 minutos.
- Fig. 10 — Solução 14 (MgCl₂ .017). Tempo de perfusão 10 minutos.
- Fig. 11 — Solução 14 (idem). Tempo de perfusão 25 minutos.

Todas as soluções são molares.



1



2



3



4

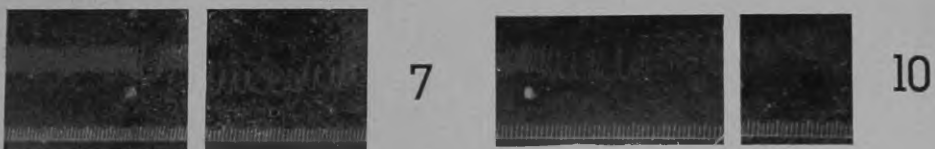
9



5



6



7

10



8

11

