

SOLUÇÃO PERFUSORA PARA *CALLINECTES DANAE* SMITH (Crustacea — Decapoda)

por *Paulo Sawaya*

(Laboratório de Fisiologia Geral e Animal — Departamento de Zoologia da Universidade de São Paulo)

(Com 9 gráficos)

Para o estudo das reações dos sistemas nervoso, muscular e cardíaco dos Crustáceos, têm sido propostas soluções isotônicas, cuja concentração varia de um para outro animal. Para os de água doce, acuradas pesquisas foram realizadas e, pelo menos para certos Decápodos, estabeleceu-se uma solução adequada para as perfusões. A mistura indicada por van Harreveld (1936, p. 428) para *Astacus trowbridgii* e *Cambarus clarkii* foi submetida a cuidadoso estudo por parte de Cole, Helfer & Wiersma (1939, p. 393). Tais autores concluíram de suas experiências que a referida solução é mais satisfatória para perfusão do coração de *Cambarus clarkii* que a de Lindeman (1928, p. 591) ou a dupla de Ringer.

Para os Crustáceos marinhos, especialmente os europeus, os diferentes líquidos perfusores aconselhados baseiam-se, em geral, na composição mineral do sangue, principalmente de *Carcinus*, de *Cancer*, de *Maja* etc., segundo os dados resultantes das indagações, entre outras, de Bethe (1929, p. 34), de Bethe & Berger (1931, p. 571), etc. Para alguns representantes americanos desta classe de Artrópodos, conhece-se o teor iônico do sangue pelas dosagens feitas principalmente por H. W. Smith, as quais foram, em 1940 (p. 575), publicadas por W. H. Cole.

Ainda recentemente, ao pesquisar a ocorrência da acetilcolina no tecido cardíaco de *C. danae* (Sawaya 1943, p. 266), tive oportunidade de anotar que êste Decápodo talvez, também, apresentasse capacidade de regulação osmótica e iônica, a exemplo do que acontece com muitos Crustáceos marinhos, como, por ex., *Carcinus*, *Cancer*, etc. (Schlieper 1929, p. 156; 1935, p. 334; Bethe 1930, p. 437; Bateman 1933, p. 355; Krogh 1939, p. 73; Webb 1940, p. 126).

Esta suposição encontra apóio ainda no fato de *C. danae* ocorrer também na água doce, tal como sucede com *C. ornatus* (Brues 1927, p. 566), pois foi capturado em pleno rio Itanhaem, em local distante da desembocadura no mar, onde a salinidade é baixíssima.

Além do mais, durante as referidas investigações verifiquei, muitíssimas vezes, que a solução preconizada por Pantin (1934,

p. 14), então empregada nas perfusões dos corações de *C. danae* provenientes de regiões de baixa salinidade, determinava ligeiras alterações do ritmo e da frequência dos batimentos cardíacos, o que não acontecia com os exemplares colhidos em zonas abertas, como, por ex., a praia de Caiobá, no Estado de Paraná, onde a salinidade é bem maior. De um modo geral, os *Callinectes* perfundidos com aquêlê soluto, depois de algum tempo, em média 15 a 20 minutos, recobravam a frequência e o ritmo cardíacos normais. Sòmente depois disso, é que se tornava possível o uso das substâncias cuja atividade sòbre o coração dêsse animal constituia o objetivo principal daquelas pesquisas.

Com exceção das referências da salinidade de Caiobá, as outras resultam de dosagens ocasionais, visto não ter sido ainda possível um estudo sistemático de tais medidas. Não obstante, pareceu-me, desde logo, que a concentração iônica do sangue do *C. danae* dependeria da concentração do meio em que o animal habita e, conseqüentemente, as perturbações do funcionamento do coração do Crustáceo correriam por conta do elevado teor dos ions da solução perfusora utilizada. Estes fenômenos estão intimamente relacionados com a regulação iônica e a osmótica, largamente estudadas nos Crustáceos, suscitando tais indagações uma série de problemas que se acham na ordem do dia. Webb (1940, p. 107), por ex., ao investigar a regulação iônica em *Carcinus maenas*, estabeleceu a íntima relação entre os dois processos de regulação, iônico e osmótico, os quais são aí largamente estudados à luz de modernos processos de pesquisa da composição mineral, concomitantemente, do sangue e do líquido em que vive êsse Decápodo. Tais pesquisas, como é sabido, dependem, em primeiro plano, do conhecimento da composição de tais flúidos. Embora ainda não me seja possível encetar a análise dêsses fenômenos reguladores em *C. danae*, valí-me da oportunidade feliz de contar com a valiosa cooperação do Dr. Rubens Salomé Pereira, que, empregando métodos colorimétricos, alguns originais, me proporcionou a avaliação dos elementos minerais do sangue daquêlê *Callinectes*. Esta medida preliminar indispensável levou-me ao estudo comparativo de algumas soluções perfusoras usuais, inclusive aquela proposta pelo Dr. R. Salomé Pereira, resultante de suas determinações da composição mineral do sangue total, e que constam do presente Boletim, à p. 147. Aguardo a próxima oportunidade para o estudo, também comparativo, com a solução a ser preparada segundo as dosagens dos elementos minerais do plasma.

Métodos.

C. danae de ambos os sexos e de diversas idades, medindo 4 a 8 cms. de comprimento, capturados no canal da baía de Santos, foram preparados para os testes de perfusão, expondo-se o coração conforme a técnica já usada anteriormente (Sawaya l.c., p. 265) Logo que o coração era exposto, transfixava-se o pericárdio com um gancho de metal conjugado com a alavanca do quimógrafo. Obtinha-se o registro das pulsações nor-

mais, com o órgão imerso no próprio sangue, e, a seguir, fazia-se a perfusão com as soluções recentemente preparadas. O pH do sangue era determinado em cada animal, aproximadamente a 7,5, e o da solução a ser perfundida então era ajustado ao mesmo. Tal cuidado era essencial, visto ser o coração de *C. danae* muito sensível a pequenas oscilações do pH, como acontece, por ex., com *Carcinus* (Bateman 1933, p. 365)

Os *Callinectes* eram pescados no canal em frente ao Forte Augusto, e logo operados no laboratório da secção da Fauna Marinha, localizado no prédio do Instituto de Pesca de Santos *). Em alguns casos foram retiradas as vísceras, principalmente o hêpato-pâncreas, cuja secreção é tóxica para o coração. Devido, porém, à pouca resistência de *C. danae* a esta operação, resolvi manter os órgãos intátos, tendo o cuidado especial de não os lesar durante a retirada da carapaça, afim de evitar a influência de seus líquidos sobre o coração. No presente trabalho foram computados unicamente os resultados obtidos com o coração *in situ*, mantidos os demais órgãos. As soluções perfusoras acham-se mencionadas na Tábela I.

A solução empregada por Welsh (1939a, p. 232) é composta na base da composição mineral do sangue de *Carcinus*, com ajuste do pH para 7, não contando, porém, o Na do bicarbonato. Este autor trabalhou com *Paranilurus*, e, verificando mais tarde que a mistura não era inteiramente apropriada, alterou o teor do K e do Mg e eliminou a uréia da fórmula anterior (1939, p. 204), tendo como resultado a fórmula figurada na tabela I. O soluto aconselhado por Pantin (1934, p. 14) apenas difere do de Welsh por conter menos CaCl_2 . Ambos acham-se dentro dos limites da concentração do sangue de *Carcinus maenas*, conforme os dados de Bethe (1929, p. 350) Davenport (1941, p. 179), ao perfundir corações de *Cancer*, depois de tentar o emprego das soluções de Welsh e de Pantin, resolveu modificar a molaridade dos componentes e ajuntar dextrose.

Como muito bem se pode vêr na tabela referida, a solução proposta por R. Salomé Pereira difere sensivelmente das três outras. A proporção dos sais corresponde à cerca de metade. Tendo um pH próximo a 6, foi o mesmo ajustado para 7,5 à custa do NaHCO_3 . No cômputo do Na não foi levado em conta este elemento proveniente do bicarbonato, por ser mínima a quantidade necessária para o ajuste do pH. Tratando-se de uma mistura de concentração tão baixa em relação às demais, e, não obstante presumir tratar-se de um crustáceo de pressão osmótica variável, foi ajuntada à solução de R. Salomé Pereira, a exemplo do que fez Davenport, a dextrose, afim de se evitarem as variações da pressão. Não obstante o teor muito baixo do NaCl, como adiante se verá, o coração dos *C. danae* funcionou melhor com o soluto de R. Salomé Pereira que com os demais. Este fato, aliás, está de acôrdo com os resultados obtidos por Viale (1927, p. 1513) sobre a ação da pressão osmótica e do NaCl sobre o automatismo cardíaco, embora este autor não mencione o animal sobre cujo coração fez as experiências.

Resultados

De acôrdo com as verificações de Bethe (1929, p. 350), Nagel (1935, p. 468) e principalmente Webb (1940, p. 126), em *Carcinus* normais, a composição iônica do sangue está sujeita a oscilações dependentes de vários fatores, especialmente, da salinidade da água em que vivem. Em média, o teor em Ca e K do sangue é

*) Agradeço aos Srs. Paiva Carvalho, Francisco de Andrade Ramos e Dr. Ayrton Gonçalves, o auxílio prestado durante as experiências aqui relatadas.

mais elevado que o do meio externo, ao passo que o do Mg é menor. Em vários outros Crustáceos, Bethe & Berger (1931, p. 173), Robertson & Webb (1939, p. 155), Robertson (1939, p. 396) et altera, mostraram que também há flutuação de tais valores nas mesmas condições.

As medidas indicadas por êstes autores, comparadas com as da concentração dos referidos elementos na água do mar, levaram-nos à conclusão de que, entre a concentração mineral do sangue e a da água, há uma diferença que varia de uma para outra espécie.

Quanto a *C. danae*, não encontrei dados positivos sôbre a concentração iônica do sangue. *C. hastatus* (hoje *C. sapidus*), porém, constituiu objeto de pesquisas por parte de H. W. Smith (ap. Cole 1940, p. 575), o qual fez as dosagens dos elementos minerais no plasma sanguíneo. Comparados os resultados dessas diferentes dosagens nos Decápodos estudados por Bethe & Berger (l.c.) por Robertson & Webb (l.c.), por Robertson (l.c.) e por Webb (l.c.) e nos *Callinectes* por H. W. Smith (Cole l.c.), com aquêles provenientes das análises em *C. danae* por R. Salomé Pereira (l.c.), notam-se sensíveis diferenças, conforme a indicação na tabéla II. Este fato deve ser levado à conta, não sômente da variação própria de cada animal, como também, do material empregado. Robertson & Webb (l.c., p. 156) e Robertson (l.c., p. 394), convem notar, adiantam que os valores indicados por Bethe & Berger e outros autores deixam muito a desejar, em virtude dos métodos precários utilizados nas determinações.

Com os *Callinectes*, em particular, as diferenças dos resultados são sensíveis. Isto pôde ser atribuído, principalmente, ao fato de H. W. Smith ter feito as dosagens do plasma enquanto R. Salomé Pereira o fez do sangue total. Embora não tenha sido possível encontrar dados referentes aos ions existentes nos elementos figurados do sangue dos *Callinectes*, seria talvez de se lembrar que no sangue humano, como é sabido, com certos ions como o Na e o Ca, a concentração no sôro é maior que no sangue total, visto como tais elementos ocorrem em quantidades menores nos glóbulos (Kramer & Tisdall 1922, p. 245). O contrário dá-se com o K. Possivelmente, as dosagens dêstes ions no sôro sanguíneo de *C. danae*, que se acham em andamento, virão esclarecer êste ponto. E' de esperar que se mostre uma distribuição desigual dos ions entre sôro e glóbulos, tal como é normal em muitos animais. Estas divergências ainda poderiam ser relacionadas com as condições do local em que foram capturados os *Callinectes* aqui estudados, i.é, no canal de Santos, em frente ao Forte Augusto.

Na literatura disponível não encontrei dados sôbre a composição mineral da água do mar nessa região. Graças, porém, à gentileza da Cia. Docas de Santos, foi-me possível valer dos resultados das dosagens relatadas pelo Dr. Mendonça *), em 1941,

*) Relatório do Dr. João Carneiro de Mendonça à Cia. Docas de Santos, à qual agradeço a autorização para publicar êstes dados.

TABELA II
Composição mineral do sangue de vários Crustáceos e da água do mar (mg/cm³).

Crustáceos	Na	K	Ca	Mg	Valores	Autor	Material
<i>Carcinus maenas</i> ..	13,27	0,293	0,498	0,646	médios	Bethe & Berger	plasma
<i>Carcinus maenas</i> ..	11,2	0,44	0,49	0,43	"	Webb 1)	"
<i>Cancer pagurus</i>	12,45	0,715	0,490	0,661	"	Bethe & Berger	"
<i>Cancer pagurus</i> ..	11,12	0,451	0,531	0,633	"	Robertson 2)	"
<i>Maja squinado</i>	13,60	1,366	1,090	1,065	máximos	Bethe & Berger	"
<i>Eriochelir sinensis</i>	11,30	0,390	0,565	—	médios	Bethe & Berger	"
<i>Panulirus vulgaris</i>	14,30	1,074	1,11	0,368	máximos	Bethe & Berger	"
<i>Callinectes sapidus</i>	10,58	0,526	0,787	0,228	médios	H. W. Smith 3)	"
<i>Callinectes danae</i>	5,85	0,380	0,34	0,22	"	Salomé Pereira	sangue total
Água do mar - Helgoland	11,20	0,533	0,42	1,130	"	Bethe & Berger	—
Água do mar - Porto de New-York.	10,37	0,42	0,615	1,24	"	H. W. Smith	—
Água do mar - Forte Augusto-Santos	9,50	0,34	0,41	1,27	mínimos	Mendonça 4)	—

1) Estes valores foram calculados aproximadamente, uma vez que Webb (1940, p. 132) não indica o conteúdo de água por cm³ nem a densidade do sangue. Para possibilitar a transformação dos dados da tabela 10 que o autor dá à referida página, para o sangue, em mg/cm³, admitiu-se um conteúdo de 950 mg de água por cm³ de sangue, valor este que dificilmente conterá erro maior que 3%. Para as finalidades desta comparação tal aproximação é suficiente.

2) Valores calculados segundo as indicações da tabela IV (Robertson 1939, p. 391)

3) Números constantes na tabela publicada por Cole (1940, p. 576) transformados em mg/cm³.

4) Relatório do Dr. João Carneiro de Mendonça, por especial obséquio da Cia. Docas de Santos.

mas, ainda não publicados. O teor mineral da água em frente àquele Forte é o seguinte, em mg/cm³: Na = 9,5 - 10,4; K : 0,34 - 0,35; Ca = 0,41 - 0,50; Mg = 1,27 - 1,39. Em comparação com o da baía de Helgoland (local de captura de *Carcinus*) e do pôrto de Nova York (onde foram colhidos os *Callinectes sapidus*), estas medidas são menores (v. Tabéla II). Sabido é que os animais eurihalinos apresentam larga variação da concentração mineral do sangue, e conhecida é a capacidade dêstes animais de se ajustarem às alterações químicas do líquido em que vivem (Adolph 1925, p. 333). Esta depende da taxa dos elementos minerais do meio que habitam, como tem sido demonstrado por muitos autores (Pantin 1931, p. 459; Robertson 1939, p. 396; Webb 1940, p. 111).

Muito embora as indicações da composição mineral do sangue de *C. danae* sejam muito baixas, a solução perfusora elaborada na base das mesmas deu resultados satisfatórios, como se verá a seguir.

A perfusão do coração de *C. danae* com a solução proposta por R. Salomé Pereira não produz, como se vê no gráfico n. 1, alteração da freqüência nem do ritmo. Apenas em alguns casos (4) se verificou uma ligeira aceleração dos batimentos cardíacos (gráfico n. 2). Também é evidente um efeito regulador das pulsações, eliminando a arritmia cardíaca, apontada no gráfico n. 3. Deixando-se um coração pulsar durante cêrca de meia hora, quando os batimentos já apresentam sensível modificação do ritmo, a intervenção dêste soluto perfusor provoca o restabelecimento da normalidade das pulsações (gráficos n. 4 e 5).

Quando se perfundem os corações do crustáceo com as misturas que foram empregadas por Davenport, em *Panulirus* e por Pantin, em *Carcinus*, notam-se certas alterações da freqüência e da intensidade dos batimentos. Sob a influência do soluto, na concentração de Davenport, há, às vezes, aumento da intensidade (gráfico n. 6) e da freqüência (gráfico n. 7), outras vezes, diminuição ainda da freqüência e da intensidade (gráfico n. 8). Na concentração aconselhada por Pantin, tais modificações não se mostram tão pronunciadas. Muitas vezes, à perfusão com êste soluto, durante longo tempo, estas alterações chegaram mesmo a desaparecer (gráfico n. 9). O mesmo se deu com o emprego da solução de Welsh.

Como se vê, a reação do coração a tais soluções não é tão pronunciada de molde a poder estabelecer uma nítida divergência entre elas, não obstante a sensível diferença das respectivas concentrações. Tal resultado, ao meu vêr, provem, principalmente, do fato de ser *C. danae* eurihalino, como já foi apontado em minhas observações anteriores (Sawaya 1943, p. 266), i.é, possui, como vários outros Crustáceos marinhos, larga capacidade osmoreguladora. Com esta asserção concorda também o fato, que aqui refiro de passagem, de alguns *C. danae* trazidos de Santos e dei-

xados no laboratório em água da torneira, terem reagido tão bem, como aquêles mantidos em água do mar, à solução de R. Salomé Pereira.

Para as pesquisas com êste crustáceo, poder-se-ia recomendar, pois, o emprego do líquido perfusor baseado na concentração iônica do sangue tal como é proposto por R. Salomé Pereira, uma vez que, como aqui foi evidenciado, não causa tal perfusão as perturbações, embora não acentuadas, que ocorrem com as outras soluções.

Finalmente, tendo sido aproveitadas as análises de R. Salomé Pereira, com seus resultados preliminares, os trabalhos em continuação, principalmente referentes às dosagens dos íons no plasma sanguíneo, possivelmente virão completar as presentes observações.

Resumo

O estudo comparativo das soluções preconizadas na perfusão cardíaca de Crustáceos marinhos conduz aos seguintes resultados:

1.º A solução perfusora elaborada na base da concentração mineral do sangue total de *Callinectes danae* não ocasiona alterações do ritmo nem da frequência dos batimentos cardíacos deste Decápodo.

2.º Em comparação com os resultados obtidos com perfusões de outros solutos aconselhados por Welsh, Pantin, Davenport, revelou-se o soluto referido (de R. Salomé Pereira) mais adequado para o aludido Crustáceo.

3.º Esta solução tem concentração mineral de cerca de metade daquelas indicadas pelos mencionados autores.

4.º Tal diferença é discutida no presente trabalho e é levada à conta da menor salinidade do meio onde os *C. danae* habitam, e da sua característica eurihalinidade e, também, por terem sido as dosagens feitas no sangue-total.

Summary

Some experiments were carried out to determine the influence of the most usual perfusing liquids on the heart of *Callinectes danae*. Previous analyses have been made, with respect to the principal inorganic constituents, of the blood of this Decapod, by Dr. Rubens Salomé Pereira (see this Boletim, p. 151). Based on these determinations a perfusing solution was proposed and experimented on *C. danae* as well as others used by Welsh (1939a, p. 232), Pantin (1934, p. 14) and Davenport (1941, p. 179). In a previous paper Sawaya (1943, p. 265) indicates a possible euryhalinity of this *Callinectes*. During the study of the occurrence of acetylcholine in cardiac tissues some hearts of *Callinectes* were

perfused with Pantin's solution. For the *C. danae* living on the sea-shore of Caiobá (State of Paraná) open to the sea with high salinity this Pantin's solution showed to be useful, but for those living in the channel of Santos, with low salinity some troubles were observed in the perfused hearts.

Several experiments were made with the referred solutions (see Table I) and some points of the osmotic and ionic regulation were discussed, as pointed out chiefly by Robertson (1939, 392), Webb (1940, p. 126). Salomé Pereira's determinations indicate a very low ionic concentration of the total blood of *C. danae*. Notwithstanding, these results obtained by colorimetric methods are preliminary (these studies will be continued in near future specially determining ionic concentration of plasma). However it will be possible to correlate the low concentration of the total-blood with the salinity of the channel sea-water (see Table II).

These experiments may support the following conclusions:

1 — For *C. danae* from the bay of Santos Salomé Pereira's solution is more satisfactory for perfusing the crustacean heart than Welsh's, Pantin's and Davenport's solutions.

2 — The perfusing solution based on the ionic concentration of the *C. danae*-blood does not produce any trouble of the heart beats (Records 1-2).

3 — This solution corresponds in average to the half concentration of those mentioned above.

4 — It would be possible to correlate this low ionic concentration of the *C. danae* blood with the low salinity of the sea-water where they live.

L I T E R A T U R A.

- Adolph, E. F. 1925, Some physiological distinctions between Freshwater and Marine Organisms. Biol. Bull., v. 48, n. 5, pp. 327-335, Lancaster, Pa. Bateman, J. B. 1933, Osmotic and Ionic Regulation in the Shore Crab, *Carcinus maenas*, with Notes on the Blood Concentrations of *Gammarus locusta* and *Ligia oceanica*. Jour. Exp. Biol., v. 10, n. 4, pp. 355-371, London. Bethé, A. 1929, Ionendurchlässigkeit der Körperoberfläche von wirbellosen Tieren des Meeres als Ursache der Giftigkeit von Seewasser abnormer Zusammensetzung. Pflüger's Archiv. v. 221, pp. 344-362, Berlin. Bethé, A. 1930, The Permeability of the Surface of Marine Animals. J. Gen. Physiol., v. 13, pp. 437-444, New York. Bethé, A. & Berger, E. 1931, Variationen im Mineralbestand verschiedener Blutarten. Pflüger's Archiv., v. 227, pp. 571-584, Berlin. Brues, C. 1927, Occurrence of the marine Crab, *Callinectes ornatus*, in brackish and free water. Amer. Nat., v. 61, pp. 566-568, resumo em Biol. Abstr., v. 3, n. 4-6 ref. 10073, Menasha, Wisc. Cole, W. H. 1940, The composition of fluids and sera of some marine animals and of the sea-water in which they live. Jour. Gen. Physiol., v. 23, n. 5 pp. 575-584, New York. 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. Davenport, D. 1941, The effects of Acetylcholine, Atropine, and Nicotine on the isolated heart of the commercial Crab, *Cancer magister* Dana. Physiol. Zool., v. 14, n. 2, pp. 178-185, Chicago. Harreveld, A. 1936, A physiological solution for fresh-water Crustacean. Proc. Soc. Exp. Biol.-Med., v. 34, pp. 428-432, New York. Kramer, B. & Tisdall, F. F. 1922, The Distribution of Sodium, Potassium, Calcium, and Magnesium between the Corpuscles and Serum of Human Blood. Jour. Biol. Chem., v. 53, pp. 241-252,

Baltimore. **Krogh, A. 1939**, Osmotic Regulation in aquatic animals. 242 pp. Cambridge.

Lindmann, V. F. 1928, Effects of Ions on Crayfish Heart Rhythm. *Physiol. Zool.*, v. 1, n. 4, pp. 576-592, Chicago.

Nagel, H. 1935, Die Aufgaben der Exkretionsorgane und der Kiemen bei der Osmoregulation von *Carcinus maenas*. *Zeit. vergl. Physiol.*, v. 21, n. 3, pp. 468-491, Berlin.

Pantin, C. F. A. 1931, The origin of the composition of the body fluids in animals. *Biol. Rev.*, v. 6, n. 4, pp. 459-482, Cambridge.

Pantin, C. F. A. 1934, On the Excitation of Crustacean Muscle. I. *Jour. Exp. Biol.*, v. 11, n. 1, pp. 11-27, London.

Robertson, J. D. 1939, The Inorganic Composition of the Body Fluids of Three Marine Invertebrates. *Ibid.*, v. 16, n. 4, pp. 387-397, London.

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. *Ibid.*, v. 16, n. 2, pp. 155-183.

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. Ci. Letr. Univ. S. Paulo*, 32, Zool. n. 7, pp. 261-303, 5 t. S. Paulo.

Salomé Pereira, R. 1944, Sobre a composição mineral do sangue do *Callinectes danae* Smith e sobre a de um líquido para perfusão. *Bol. Fac. Ci. Letr. Univ. S. Paulo* XLI, Zool. n. 8, pp. 143-156, S. Paulo.

Schlieper, C. 1929, Neue Versuche über die Osmoregulation wasserlebender Tiere. *Sitz. Gesel. z. Beförd. d. g. Naturwiss. z. Marburg.*, v. 64, n. 6, pp. 143-156, Berlin.

1935, Neuere Ergebnisse und Probleme aus dem Gebiet der Osmoregulation wasserlebender Tiere. *Biol. Rev.*, v. 10, n. 3, pp. 334-360, Cambridge.

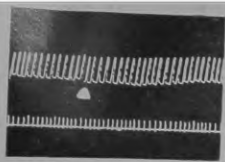
Viale, G. 1927, Action de la Pression osmotique et du Chlorure de Sodium sur l'Automatisme cardiaque. *C. R. Soc. Biol. Paris.*, v. 97, pp. 1513-1514, Paris.

Webb, D. A. 1940, Ionic Regulation in *Carcinus maenas*. *Proc. Roy. Soc. London. Series B*, n. 854, v. 129, pp. 107-135, London.

Welsh, J. H. 1939, Chemical Mediation in Crustaceans. I. The Occurrence of Acetylcholine in Nervous Tissues and its Action on the Decapod Heart. *Journ. Exp. Biol.*, v. 16, n. 2, pp. 189-219, London. — 1939a, *Idem*. II. The Action of Acetylcholine and Adrenalin on the isolated Heart of *Panulirus argus*. *Physiol. Zool.*, v. 12, n. 3, pp. 231-237, Chicago.

Explicação dos gráficos

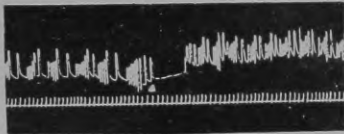
1. Perfusão do coração de *C. danae* com a solução proposta por R. Salomé Pereira.
2. *Idem*. Nota-se ligeira modificação da frequência.
3. *Idem*. Regulação dos batimentos cardíacos.
4. *Idem*. Restabelecimento das pulsações no ritmo normal.
5. *Idem*. A distância entre os gráficos corresponde a 10 minutos.
6. Perfusão do coração de *C. danae* com a solução proposta por Davenport. Aumento da intensidade.
7. *Idem*. Aumento da frequência.
8. *Idem*. Diminuição da frequência e da intensidade.
9. Perfusão do coração de *C. danae* com a solução proposta por Pantin. (a) volta à normalidade. A distância entre os gráficos corresponde a 20 minutos.



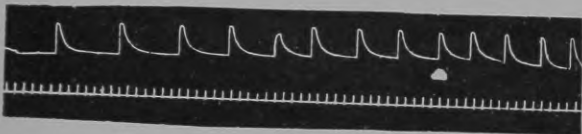
1



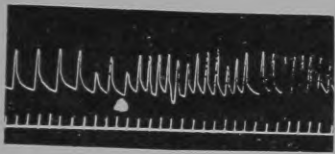
2



3



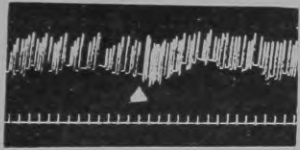
5



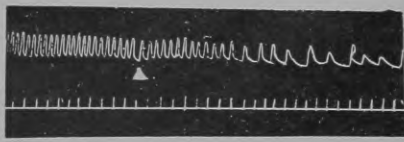
4



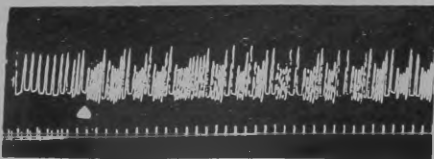
6



7



8



9

