

CONTEÚDO MINERAL DO SANGUE DE INVERTEBRADOS MARINHOS (*)

DOMINGOS VALENTE E ANTONIETA BRUNO

(Departamento de Fisiologia Geral e Animal — Universidade de S. Paulo)

Í N D I C E

	Pg.
1 — Introdução	303
2 — Material	304
3 — Métodos de pesquisas	304
a) Determinação do sódio	305
b) " " potássio	306
c) " " cálcio	306
d) " " magnésio	307
e) " " cloretos	307
f) " " sulfatos	307
4 — Resultados e comentários	308
5 — Resumo	316
6 — Summary	318
7 — Bibliografia	318

1 — INTRODUÇÃO

Entre os invertebrados marinhos cuja composição do líquido cavitário difere da do meio ambiente, contam-se representantes dos Equinodermas e dos Tunicados, animais de pressão osmótica dos líquidos internos tão variável, a ponto de a composição destes líquidos acompanhar muito de perto as mudanças que se operam na água do mar. Como se sabe, êste fenômeno está intimamente relacionado com a permeabilidade dos tecidos. Neste particular, o que se refere à regulação nos Invertebrados é muito pouco conhecido. Apesar dos métodos outróra empregados terem sido poucos exatos, como acentuam ROBERTSON e WEBB (1939, p. 155), o que se conhece a respeito da regulação osmótica de muitos invertebrados estudados, decorre dos trabalhos antigos de FREDERICQ (1882-1904) e BOTAZZI (1897-1908) mencionados na resenha de BETHE (1930).

Os animais estudados por aqueles autores, *Aplysia* e *Carcinus* foram novamente investigados por BETHE (l. c. p. 444) que concluiu serem os

(*) Trabalho realizado, em parte, com o auxílio dispensado pela Comissão de Pesquisa Científica da Universidade de São Paulo, sob a presidência do Prof. Dr. ERNESTO DE SOUZA CAMPOS, a quem agradecemos. Somos também gratos ao Dr. RUBENS SALOMÉ PEREIRA por nos ter facultado o emprego de seus métodos, sendo um deles ainda inédito, e ao Prof. Dr. PAULO SAWAYA pelos conselhos e valiosas sugestões e pela revisão crítica do manuscrito.

mesmos permeáveis à água do mar e aos sais nela dissolvidos. Segundo esse autor, a pele desses invertebrados os protegeria apenas contra a perda de substâncias coloidais.

Por sua vez MARGARIA (1931, p. 612) observou que *Carcinus maenas* regula a pressão osmótica, visto manter-se muito tempo em água do mar diluída ao terço. Adianta ainda que a permeabilidade à água do mar e aos seus sais dá-se pelas brânquias. Dados mais precisos do equilíbrio osmótico entre o líquido cavitário e o meio ambiente, encontram-se nos trabalhos de OKAZAKI e KOIZUMI (1926), BETHE e BERGER (1931), KROGH (1939), ROBERTSON e WEBB (1939), COLE (1940), WEBB (1940) e ROBERTSON (1949), que serão comentados na discussão deste trabalho.

Ocupar-nos-emos da determinação do conteúdo mineral do líquido cavitário e sangue de Moluscos, Equinodermas e de Tunicados. Ao confrontarmos vários resultados com os dos autores acima mencionados verificamos vários pontos dignos de nota. Além disso, para a execução de determinadas experiências fisiológicas que requerem o emprego de soluções perfusoras, é necessário o conhecimento do teor iônico do fluido cavitário destes animais. Com estes fatos julgamos justificar o presente trabalho.

2 — MATERIAL

Os animais foram coletados na Ilha de São Sebastião, no litoral norte do Estado de São Paulo, na altura do paralelo 23°50', distante cerca de 60 milhas do porto de Santos, situado a SW. No momento de captura colheram-se amostras de água do mar do mesmo local. Os ouriços *Echinometra locunter* L. (vulgarmente conhecido por Pindá ou Ouriço preto), *Lytechinus variegatus* LESKE (Ouriço lilás) e *Echinaster brasiliensis* MUELL E TR. (Estrela do mar), assim como o Tunicado *Ascidia nigra* (SAV.) e o Molusco *Aplysia* sp., logo depois de capturados foram transportados para uma sala que conseguimos em Ilhabela graças à gentileza do Eng. Sr. LAMBERTO WOLF. Retirou-se o líquido cavitário da seguinte maneira: com uma seringa de cerca de 20 ml., provida de agulha grossa de metal, punccionou-se então a cavidade do corpo através da membrana bucal dos Ouriços, aspirando-se cerca de 20 ml. de um líquido opalescente, que era guardado em tubos de ensaio.

Os Tunicados eram primeiramente libertados da túnica celulósica de modo a se expôr o vaso cardíaco, o qual se punccionou com agulha fina, daí retirando-se 1 a 2 ml. de sangue.

Os tubos de ensaio arrolhados e conservados em lugar fresco, foram transportados para o Departamento de Fisiologia Geral e Animal e mantidos na geladeira. Operação idêntica fez-se com os outros Equinodermas. Da *Aplysia* analisou-se o líquido purpureo.

3 — MÉTODOS DE PESQUISAS

Cada uma das amostras apresentava-se como um líquido contendo um precipitado no fundo do tubo, constituído pelo conglomerado dos corpusculos existentes na cavidade do corpo dos animais. Esse líquido total foi o usado por nós na incineração.

KOIZUMI (1932, p. 264) desproteínisa o material biológico pelo ácido acético a 25%, ROBERTSON e WEBB (1939, p. 458) empregam ácido sulfúrico

a 25%. Preferimos a incineração por via húmida pela vantagem que oferece de se obter ao mesmo tempo a desproteinização e a cinza do material a ser estudado. Usámos a técnica de KAHANE modificada por SALOMÉ PEREIRA (1945, p. 625) obtendo-se um líquido claro, transparente, desproteinizado e livre de substâncias orgânicas. A incineração por via húmida consiste em tratar o material biológico por uma mistura nitro-perclórica (3 partes de ácido nítrico e uma parte de ácido perclórico) e aquecê-lo em banho de areia, elevando-se a temperatura gradualmente até 135°C. A solução deve ferver calmamente até a eliminação de vapôres castanhos nitrogenados. Assim que o líquido ficar completamente claro, a temperatura é elevada para 205°C. Terminada a evaporação obtem-se um resíduo branco amarelado, e então a temperatura é elevada até 250° até que um excesso de ácido perclórico seja removido. O tubo é a seguir aquecido diretamente na chama até não haver mais despreendimento de vapôres brancos. Deixa-se esfriar normalmente e dissolve-se então o resíduo com ácido clorídrico de maneira que, ao se completar o volume final, se obtenha um ácido clorídrico 0.1 N. Como os métodos que empregámos possibilitam determinações em individuo por individuo do teor dos elementos minerais existentes no fluido, já para a incineração empregámos quantidades exatamente medidas. Por isso tomámos de 0.5 a 1 ou 2 ml do líquido cavitário ou do sangue de acôrdo com as amostras disponiveis. Essas alíquotas foram colocadas em tubos de Pyrex de 20 cm. de comprimento por 2 cm. de diâmetro graduados a 2.5 ; 5 ; 7.5 e 10 ml.

a) DETERMINAÇÃO DO SÓDIO

Geralmente é isolado sob a forma de acetado tríplice de sódio, uranila e zinco. Êste último metal pôde ser substituído por : Manganês, Magnésio, etc. ROBERTSON e WEBB (1. c., p. 159) isolaram-no como acetado triplice de sódio, uranila e zinco, dosando o sódio gravimetricamente. KOIZUMI (1. c., p. 265) usou o método de KRAMMER e GITTLEMAN (1924, p. 354) que consiste em precipitar o sódio na forma de piroantimoniato de sódio e indiretamente dosá-lo iodometricamente. Seguimos em nossas determinações o método indicado por SALOMÉ PEREIRA (1945, p. 70) por ser mais sensível e por dispensar a separação prévia de certos interferentes. Êste método é o de KAHANE e DUMONT (1932, p. 1258). Consiste em precipitar o sódio sob a forma de acetado triplice de sódio, uranila e magnésio, dissolvendo-se o precipitado com sulfocianato de amônio segundo HOFFMAN (1941 p. 174) e medindo-se a côr no fotômetro de Klett. As operações são as seguintes : depois de preparado o material tomam-se as alíquotas necessárias, colocando-as em tubos graduados de centrífuga. Adicionam-se 3 ml de acetado duplo de uranila e magnésio, agita-se, deixa-se 24 horas em repouso. Centrifuga-se, aspira-se e lava-se com liquido de lavagem (50 ml de éter sulfúrico ; 50 de alcool etílico e mais uma pitada de acetato tríplice de sódio, magnésio e uranila) três vêzes, decantando-se na última vez. Dissolve-se então o precipitado com sulfocianato de amônio 0,1 N e completa-se o volume com o mesmo a 10 ou 15 ml (conforme a intensidade da côr). Ê necessário fazer sempre um branco de reagentes e um padrão com quantidades conhecidas de sódio para comparar no fotômetro. Usámos filtro S-K 42. Preferimos o emprego de sulfocianato de amônio 0.1 N pela vantagem que oferece de independer da temperatura.

b) DETERMINAÇÃO DO POTÁSSIO

ROBERTSON e WEBB (1. c. p. 161) determinaram-no como cobaltinitrito de sódio e prata e dosaram-no titrimetricamente com sulfato cérico, segundo LINDNER e KIRK (1937, p. 291) ao passo que KOIZUMI (1. c. p. 215) usou o método de KRAMMER e TISDALL (1921, p. 339). Este método consiste em precipitar o potássio sob a forma de cobalto nitrito de potássio, oxidando o precipitado com permanganato de potássio e adicionando-se oxalato de sódio até a descoloração. O excesso de oxalato é então dosado titrimetricamente pelo permanganato de potássio. Em nossas pesquisas usamos o processo de SALOMÉ PEREIRA (1945, p. 619) que consiste no seguinte : isola-se o potássio como cobaltinitrito de prata e potássio e determina-se o cobalto fotométricamente com dimetilglioxima e benzidina. Preferimos a ortotolidina em vez de benzidina para o desenvolvimento da cor, segundo SPACU e MACAROVICI 1935, (apud SNELL e SNELL 1949, p. 375). O processo é o seguinte : depois da destruição nitroperclórica, tomam-se alíquotas necessárias, neste caso 0.1 ml e colocam-se em tubos graduados de centrifuga. Para o caso da água do mar, há necessidade de eliminar os cloretos para evitar precipitação da prata do reagente. Para isso evapora-se em banho de ar a alíquota tomada, trata-se com algumas gotas de ácido sulfúrico 2N, evapora-se novamente, esfria-se e dilue-se com 0.5 ml de água destilada. Coloca-se então, uma gota de vermelho de metila, algumas gotas de uma solução de carbonato de sódio saturada até alcalinização e deixa-se durante alguns minutos em banho-maria. Centrifuga-se, se houver formação de carbonatos, faz-se a eliminação dos mesmos por reprecipitação com carbonato de sódio. Acidula-se, então, com ácido acético (1:4) e deixa-se em banho-maria até a eliminação total do CO₂, conservando a solução ligeiramente ácida. Esfria-se e precipita-se, então, com cobaltinitrito de sódio e prata, colocando-se uma quantidade correspondente a da solução que se encontra no tubo de centrifuga. Agita-se e deixa-se em repouso na geladeira durante 24 horas. Centrifuga-se, aspira-se e lava-se com água destilada na primeira vez e nas seguintes lava-se com água-acetona (1:1) decantando-se na última vez. O precipitado é dissolvido com 0.5 ml de ácido fosfórico N ficando 5 minutos em banho-maria. Esfria-se e desenvolve-se a cor com 0.5 ml de dimetilglioxima (1% em alcool etílico 95%) e 0.2 ml de ortotolidina (1% em alcool etílico a 95%). Coloca-se então, 1.5 ml de acetato de sódio saturado, agita-se e completa-se com água destilada o volume a 10 ml ou 15 ml, conforme a intensidade da cor. Faz-se a leitura no fotômetro com filtro S-K 42 e calculam-se os resultados com branco dos reagentes e com padrão de comparação.

c) DETERMINAÇÃO DO CÁLCIO

Têm sido na verdade problema de envergadura a determinação do cálcio por causa da interferência do magnésio, estrôncio, etc. Principalmente a ocorrência do magnésio na água do mar é óbice que dificulta a determinação do cálcio. ROBERTSON e WEBB (1. c. p. 166) precipitaram e reprecipitaram-no na forma de oxalato de cálcio, trataram-no com sulfato cérico, cujo excesso foi titulado com sulfato de amônio e ferro 0.006 N. KOIZUMI (1. c., p. 265) usou o método de CLARK e COLLIP (1925, p. 462) que é uma modificação do método de KRAMMER e TISDALL. Consiste em precipitar o cálcio na forma de oxalato de cálcio e liberar o ácido oxálico com ácido sulfúrico. Titula-se

o ácido oxálico com permanganato de potássio. Devemos a SALOMÉ PEREIRA a valiosa contribuição para vencer as dificuldades apontadas na dosagem do cálcio. O seu método (no prelo) em resumo, consiste em isolar o cálcio na forma de oxalato de cálcio. Este é dissolvido em ácido sulfúrico, o ácido oxálico liberado é reduzido a glicólico (com magnésio metálico em pó), e obtem-se pela adição de 2,7-dihidroxinaftalena o desenvolvimento de uma cor que é comparada no fotômetro de Klett, usando-se filtro S-K 54.

d) DETERMINAÇÃO DO MAGNÉSIO

KOIZUMI (1. c., p. 265) para sua determinação empregou o método de DENIS (1922, p. 411) dosando indiretamente o magnésio do fosforo presente no fosfato de amônio e magnésio. Ao passo que ROBERTSON e WEBB (1. c. p. 167) precipitam e reprecipitam o metal com 8-dihidroxiquinoleína e o precipitado brominado é dosado iodométricamente. Preferimos o método que emprega o amarelo de tiazol (*Titan Yellow*) por ser mais simples, e mais rápido que os outros e bastante satisfatório. O amarelo de Tiazol é um derivado do dehidrotioparatoluidina sulfônico ácido, que quando adsorvido pelo hidróxido de magnésio dá uma coloração avermelhada para 5 mg de magnésio por litro. A técnica usada foi a seguinte: o material já incinerado por via húmida foi colocado em tubos graduados de centrifuga de 15 ml de capacidade. Adiciona-se 1 ml de sacarose a 5%, dilue-se mais ou menos a 5 ml e, adiciona-se 0.3 ml de cloridrato de hidroxilamina a 5%.

Coloca-se então 0.3 ml de *Titan Yellow* a 0.05%. Depois de bem agitado junta-se 1.5 ml de hidróxido de sódio 2 N. Deve-se verificar o pH para que o mesmo seja maior que 12 afim de se obter melhores resultados. Completa-se o volume a 10 ml com água destilada e lê-se no fotômetro Klett com filtro S-K 54 contra branco de reagentes. Faz-se ao mesmo tempo um padrão de comparação.

e) DETERMINAÇÃO DE CLORETOS

BIALASZEWICZ (1933, p. 42) usa o método de VOLHARDT. KOIZUMI (1. c., p. 265) usa em parte o método de WHITEHORN e em parte o de VOLHARDT. Empregamos para as determinações de cloretos os mesmos métodos utilizados por ROBERTSON e WEBB (1. c., p. 170). Isto é, para cloreto da água do mar, o método de MOHR que consiste na titulação direta com nitrato de prata, usando o cromato de potássio como indicador. Como o mesmo não é adequado para soluções contendo proteínas, no caso dos líquidos cavitários dos Equinodermas adotamos o método de SENDROY, modificado por VAN SLYKE e HILLER (1947, p., 107) que consiste no seguinte: Adição de iodato de prata sólido na solução a ser analisada. Como este é mais solúvel que o cloreto de prata, o cloreto é precipitado na forma de cloreto de prata e os iões de iodato passam para a solução. Quando a reação está completa, a solução é filtrada e o iodato tratado com iodeto de potássio suficiente para liberar o iodo que é titulado com tiosulfato de sódio de título conhecido.

f) DETERMINAÇÃO DE SULFATOS

BIALASZEWICZ (1. c., p. 42) prefere o método gravimétrico ($BaSO_4$) para enxofre inorgânico, ao passo que KOIZUMI (1. c., p. 265) adota o de WAKEFIELD. Usamos para as determinações de sulfato da água do mar e do líquido

cavitário o método usado por ROBERTSON e WEBB (1. c., p. 174) que consiste no seguinte: Inicialmente o líquido cavitário foi desproteínizado pela adição de cloreto de mercúrio segundo os mesmos autores (1. c., p. 159). Um indicador, rodizonato de sódio preparado especialmente, é adicionado a uma solução titulada de cloreto de bário, dando rodizonato de bário de uma cor vermelha com ligeiros tons de amarelo opalescente. À medida que se adiciona a amostra a ser analisada e que contém sulfato, o bário vai sendo precipitado na forma de sulfato de bário. Desde que exista um excesso de bário na solução ela se mantém avermelhada. Quando o sulfato existente fôr suficiente para precipitar todo o bário há um empaldecimento gradual da solução até amarelo muito claro. Pela diferença das quantidades usadas de soluções tituladas exatamente medidas, calcula-se a quantidade de sulfato existente.

4 — RESULTADOS E COMENTÁRIOS

A análise das tabelas 1, 2, 3, 4, 5, e 6, que contêm os resultados das nossas determinações de Na, K, Ca, Mg no líquido cavitário de *Lytechinus variegatus*, *Echinometra locunter*, *Echinaster brasiliensis* LUEDERWALDT, (1925, p. 56) e *Ascidia nigra*, do líquido purpúreo de *Aplysia* e da água do mar do local respectivo, permitem-nos algumas observações interessantes.

T A B E L A 1

COMPOSIÇÃO MINERAL DO LÍQUIDO CAVITÁRIO DE *Lytechinus variegatus*.

Quantidades em mgr per 100 cm³

Animal	Determinação	Na	K	Ca	Mg
5c	1	578.00	41.06	61.10	63.00
5c	2	578.00	41.06	61.10	63.00
4c	3	530.30	33.75	59.80	59.50
4c	4	530.30	36.00	59.80	59.50
7c	5	682.00	56.02	58.50	68.25
7c	6	682.00	54.29	58.50	68.25
8c	7	682.00	51.19	46.80	68.25
8c	8	682.00	49.50	46.80	68.25
31c	9	656.50	43.89	48.10	68.25
31c	10	656.50	42.74	48.10	68.25
28c	11	770.80	63.00	43.26	129.50
28c	12	770.80	63.00	43.26	129.50
15c	13	656.50	54.86	58.50	73.50
15c	14	656.50	54.86	58.50	73.50
29c	15	682.00	54.29	58.50	77.00
29c	16	682.00	54.29	58.50	77.00
32c	17	656.50	52.31	74.10	68.25
32c	18	656.50	52.31	74.10	68.25
3c	19	846.00	69.75	50.09	133.00
3c	20	846.00	67.50	50.09	133.00
38c	21	682.00	50.63	68.90	78.75
38c	22	682.00	50.63	68.90	78.75
41c	23	682.00	56.02	58.50	66.50
41c	24	682.00	56.60	58.50	66.50
MÉDIA		672.46	51.60	57.17	79.47

A quantidade Na, K, Ca, Mg, varia de indivíduo para indivíduo em todos os animais por nós estudados.

Assim, se tomarmos cada um dos ions em separado, e compararmos os números respectivos com os da água do mar do local da colheita, veremos que a concentração de Potássio nos fluidos é maior que na água do mar, e o contrário dá-se com o Magnésio. Isto concorda com os resultados obtidos por BIALASZEWICZ (1933, p. 46) em animais dos mesmos filos. Especialmente os resultados referentes ao Potássio estão de acôrdo com os de ROBERTSON (1950, p. 187) que trabalhou com Equinodermas. Para êste autôr, sômente o Potássio é regulado, sendo que a taxa elevada desse elemento no sistema vascular pôde ser atribuída à absorção ativa dêste ion da água do mar, pelas paredes dos pés ambulacrários, associada, de certo modo, à grande necessidade de Potássio dos músculos desses órgãos e dos das empôlas.

Esta variação da concentração iônica é muito discutida pelos vários autôres. BETHE e BERGER (1931, p. 578) são de opinião que esta variação é individual e específica, existindo no animal uma tendência à diminuição do conteúdo do Magnésio e ao aumento do Potássio em relação à água do mar. Ainda êstes autôres chamam a atenção para o fato de em *Echinus esculentus* e em *Holothuria stellata* haver diferenças de concentração iônica relacionadas com as estações do ano, e que nestes animais a concentração do Cálcio e do Potássio é um pouco maior no líquido ambulacrário que no líquido cavitário.

Quanto aos Tunicados, os resultados de nossas análises em *Ascidia nigra*, diferem dos de WEBB (1939, p. 500) em *Ascidia mammillata* na qual o teôr de Potássio, de Cálcio, de Magnésio e de Sódio (por diferença) está em plano quasi idêntico ao da água do mar, caso que não ocorre com a nossa *A. nigra*. Nesta, há aumento das concentrações do Sódio e do Potássio, sendo menores as do Cálcio e do Magnésio.

T A B E L A 2

COMPOSIÇÃO MINERAL DO LÍQUIDO CAVITÁRIO DE *Echinometra locunter*.

Quantidades em mgr. por 100 cm³

Animal	Determinação	Na	K	Ca	Mg
1c	25	909.00	63.52	49.00	102.30
1c	26	909.00	62.37	49.00	102.30
2c	27	757.50	60.06	57.20	101.50
2c	28	757.50	63.52	57.20	101.50
30c	29	691.68	63.00	40.48	112.00
30c	30	691.68	63.00	42.67	112.00
13c	31	758.40	52.80	44.00	112.00
13c	32	758.40	52.80	44.00	112.00
36c	33	758.40	70.40	40.70	—
36c	34	758.40	70.40	40.70	—
12c	35	800.00	64.78	44.00	101.50
12c	36	800.00	62.37	44.00	101.50
24c	37	729.58	48.40	35.46	112.00
24c	38	729.58	48.40	35.46	112.00
MÉDIA		772.08	60.41	44.56	107.70

TABELA 3

COMPOSIÇÃO MINERAL DO SANGUE DE *Ascidia nigra* — TunicadoQuantidades em mgr per 100 cm³

Animal	Determinação	Na	K	Ca	Mg
17c	39	977.00	75.68	41.04	93.80
17c	40	977.00	75.68	41.04	93.80
16c	41	814.85	65.10	45.00	92.80
16c	42	814.85	65.10	45.00	92.80
35c	43	930.55	65.10	46.80	94.08
35c	44	930.55	65.10	46.80	94.08
26c	45	986.45	—	37.08	93.80
26c	46	986.45	—	37.08	93.80
MÉDIA		927.33	68.62	41.48	93.62

Ainda mais, a comparação dos resultados obtidos nas determinações feitas em Equinodermas, em Moluscos e em Tunicados revela acentuadas diferenças dos elementos correspondentes. Assim, se levarmos em conta apenas as médias dos resultados relativos ao Sódio, ao Potássio, ao Cálcio, e ao Magnésio poderemos verificar na tabela 13 que o teor desses elementos é bem diferente em cada um dos grupos considerados. Deduzimos daí que, não obstante ser o mesmo líquido do meio ambiente, cada grupo destes animais reage de modo específico mantendo um fluido próprio, não obstante ser sensível a variação individual do teor mineral desse fluido.

TABELA 4

COMPOSIÇÃO MINERAL DO LÍQUIDO CAVITÁRIO DE *Echinaster brasiliensis*Quantidades em mgr per 100 cm³

Animal	Determinação	Na	K	Ca	Mg
25c	47	858.00	46.20	72.80	105.00
25c	48	858.00	47.36	72.80	105.00
MÉDIA		858.00	46.78	72.80	105.00

A fim de confirmar a existência de variação do teor iônico nos fluidos dos organismos desses animais, resolvemos colher novo material para novas determinações. Aproveitamos, então, a oportunidade para estender nossos estudos aos cloretos e aos sulfatos.

TABELA 5

COMPOSIÇÃO MINERAL DO LÍQUIDO DA GLÂNDULA DE *Aplisia*Quantidade em mgr per 100 cm³

Animal	Determinação	Na	K	Ca	Mg
14c	49	521.13	48.40	35.46	58.33
14c	50	521.13	48.40	35.46	58.33
MÉDIA		521.13	48.40	35.46	58.33

TABELA 6

COMPOSIÇÃO DA ÁGUA DO MAR DO LITORAL DA ILHA DE SÃO SEBASTIÃO — Ilhabela

Determinação Local	Data	Temp. Co	pH	Gr Cl ² /litro	Mgr O ² /litro	mgrs %			
						Na	K	Ca	Mg
51 Região do Pontão de Ilhabela	29-3-49	25.5	7	18.7072	3.94	752.01	45.76	45.63	112.00
52 Região do Pontão de Ilhabela				18.7072	3.97	752.01	45.76	45.63	112.00
53 Reg. das Pedras (Pta. de Sta. Tereza)	30-3-49	26.5	7	18.7072	4.21	752.01	48.40	43.12	112.00
54 Região das Pedras ..				18.7072	4.23	752.01	48.40	43.12	112.00
55 Região dos Ouriços (Sao Grande)	28-3-49	27.0	7	18.5856	4.23	752.01	45.76	43.12	108.50
56 Região dos Ouriços ..				18.5856	4.23	752.01	45.76	43.12	108.50

Resultou das novas análises cujos dados se agrupam na tabela 7, haver ainda uma variação sensível quanto ao teor dos cátions, mas quasi negligenciável quanto ao dos ânions, isto considerando-se cada indivíduo separadamente.

Ora, essa variação individual pode ser melhor apreciada pela comparação da tabela 7 com as tabelas 1 e 2. Dos ions analisados, entre os que apresentam maior variação individual, vem em primeiro lugar o Sódio, fato que julgamos correr por conta da diversidade de época de colheita.

Vejamos agora o que ocorre com os ânions.

Confrontando os dados da tabela 7 relativos ao teor de SO₄ na água do mar e nos fluidos dos Equinodermas, notaremos acentuado aumento de SO₄ na água.

T A B E L A 7

Espécie	N.º Animal	Determinação	mgrs por 100 cc de líquido										milimoles por litro						
			Na	K	Ca	Mg	Cl	SO ₄	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	MgSO ₄	Na	K	Ca	Mg	Cl	SO ₄
<i>Lytechinus variegatus</i>	1	1	939.00	58.76	51.97	98.00	1772.5	172.9	2386.5	112.0	143.9	212.2	216.8	408.3	15.82	12.96	40.29	500	17.99
<i>Lytechinus variegatus</i>	1	2	939.00	58.76	51.97	98.00	1772.5	172.9	2386.5	112.0	143.9	212.2	216.8	408.3	15.82	12.96	40.29	500	17.99
<i>Lytechinus variegatus</i>	2	3	939.00	57.63	55.82	86.00	1719.3	172.9	2386.5	109.8	154.5	165.2	216.8	546.0	14.68	13.92	35.36	485	17.99
<i>Lytechinus variegatus</i>	2	4	939.00	57.63	55.82	86.00	1719.3	172.9	2386.5	109.8	154.5	165.2	216.8	546.0	14.68	13.92	35.36	485	17.99
<i>Echinometra locunter</i>	1	5	910.00	55.37	51.97	91.20	1719.3	163.3	2317.2	105.5	143.9	223.7	204.5	395.6	14.16	12.96	37.50	484	16.99
<i>Echinometra locunter</i>	1	6	910.00	55.37	51.97	91.20	1719.3	163.3	2317.2	105.5	143.9	223.7	204.5	395.6	14.16	12.96	37.50	484	16.99
<i>Echinometra locunter</i>	2	7	939.00	57.63	52.82	91.20	1719.3	163.3	2386.5	109.8	146.5	223.7	204.5	408.3	14.68	13.17	37.50	484	16.99
<i>Echinometra locunter</i>	2	8	939.00	57.63	52.82	91.20	1719.3	163.3	2386.5	109.8	146.5	223.7	204.5	408.3	14.68	13.17	37.50	484	16.99
<i>Echinometra locunter</i>	3	9	910.00	58.76	51.97	92.40	1737.0	172.9	2317.2	112.0	143.9	190.3	216.8	395.6	15.82	12.96	37.99	489	17.99
<i>Echinometra locunter</i>	3	10	910.00	58.76	51.97	92.40	1737.0	172.9	2317.2	112.0	143.9	190.3	216.8	395.6	15.82	12.96	37.99	489	17.99
Água do mar	-	11	949.00	53.11	51.97	106.40	1808.0	240.1	2412.1	101.2	143.9	176.6	300.9	526.0	13.58	12.96	43.75	510	24.99
Água do mar	-	12	949.00	53.11	51.97	106.40	1808.0	240.1	2412.1	101.2	143.9	176.6	300.9	526.0	13.58	12.96	43.75	510	24.99
<i>Echinarrachinus parma</i>																		488	
<i>Strongylocentrotus drobachienensis</i>																		488	
Água do mar																		483	

• Dados retirados de Cole (1940, pp. 578) tabela 1

Segundo KOIZUMI (1932, p. 309), atendendo a uma certa seletividade, a taxa de penetração dos íons para a permeabilidade da superfície total do animal é a seguinte: K é maior que Ca, Mg, Na, e Cl é maior que SO₄. Daí, talvez, a menor quantidade de sulfato encontrada no líquido dos Echinodermas por nós estudados. Interessante notar a tabela de KOIZUMI publicada por KROGH (1939, p. 35) em que mostra a alta percentagem de sulfato encontrada nos corpúsculos de *Caudina chilensis*. Neste animal o sulfato é seis vezes mais concentrado que na água do mar, não obstante serem tais membranas vivas dificilmente permeáveis aos SO₄. Isto pode ser considerado como uma atividade seletiva especial que requer consumo de energia.

Há pois, um acúmulo de íons na célula viva os quais, segundo PANTIN (1931, p. 479) são consequência imediata das propriedades especiais dos íons e da atividade contínua das membranas. Não quero sugerir com isto, diz êsse autôr, "que o problema da manutenção da composição do fluido do corpo seja um problema simplesmente físico. Ainda que fôsse êsse o caso nos invertebrados marinhos, onde as etapas podem ser traçadas por simples equilíbrio com a água do mar, certamente não seria verdade nos casos de animais da água doce e dos terrestres. Nestes, o meio externo não tem mais uma composição semelhante à do fluido do corpo, ainda que a composição deste último mantenha alguma semelhança com a de água do mar".

T A B E L A 8

RELAÇÕES DE CLORINIDADE DA ÁGUA DO MAR E DOS *Echinoidea*s

ESPECIE	Animal	Determ. n.º	Na/Cl	K/Cl	Ca/Cl	Mg/Cl	SO ₄ /Cl
<i>Lytechinus variegatus</i>	1	1	0.529	0.0331	0.0293	0.0552	0.0975
<i>Lytechinus variegatus</i>	1	2	0.529	0.0331	0.0293	0.0552	0.0975
<i>Lytechinus variegatus</i>	2	3	0.546	0.0325	0.0324	0.0500	0.1005
<i>Lytechinus variegatus</i>	2	4	0.546	0.0325	0.0324	0.0500	0.1005
<i>Echinometra locunter</i>	1	5	0.529	0.0322	0.0302	0.0529	0.0949
<i>Echinometra locunter</i>	1	6	0.529	0.0322	0.0302	0.0529	0.0949
<i>Echinometra locunter</i>	2	7	0.546	0.0325	0.0307	0.0529	0.0949
<i>Echinometra locunter</i>	2	8	0.546	0.0325	0.0307	0.0529	0.0949
<i>Echinometra locunter</i>	3	9	0.523	0.0338	0.0298	0.0531	0.0995
<i>Echinometra locunter</i>	3	10	0.523	0.0338	0.0298	0.0531	0.0995
Água do Mar	—	11	0.524	0.0289	0.0287	0.0588	0.1328
Água do Mar	—	12	0.524	0.0289	0.0287	0.0588	0.1328
<i>Echinarrachnius parma</i> *			0.857	0.0189	0.0192	0.1010	0.0611
<i>Strongylocentrotus drobachiensis</i> *			0.861	0.0199	0.0196	0.0996	0.0594
Água do Mar *			0.861	0.0188	0.0195	0.1040	0.0629

* Dados retirados de Cole (1940, pp. 578). Tabela I.

Se analisarmos os resultados obtidos comparando-os com os de COLE (1940, p. 578) e considerando os valores em mM de Cloro por litro poderemos vêr a semelhança acentuada do que ocorre em nossos *Lytechinus variegatus* e *Echinometra locunter* com *Echinarrachnius parma* e *Strongylocentrotus drobachiensis* por êle estudados. Tal semelhança ainda é evidente quanto ao teor do Cl na água do mar de Nova York e de São Sebastião (Tab. 7).

Considerando (Tabela 8) as relações Na/Cl, K/Cl, Ca/Cl, Mg/Cl e SO₄/Cl obtidas pelas análises dos nossos animais e pela da água do meio ambiente e as mesmas relações indicadas no trabalho do referido autor nota-se uma variação bastante grande, mas dentro dela é evidente um certo equilíbrio.

T A B E L A 9

RELAÇÃO IÔNICA ENTRE OS MEIOS INTERNO E EXTERNO

ESPECIE	LOCAL	$\frac{Na^i}{Na^e}$	$\frac{K^i}{K^e}$	$\frac{Ca^i}{Ca^e}$	$\frac{Mg^i}{Mg^e}$	$\frac{Cl^i}{Cl^e}$	$\frac{SO_4^i}{SO_4^e}$
		<i>Lytechinus variegatus</i>	São Sebastião	0.989	1.106	1.000	0.921
<i>Lytechinus variegatus</i>	São Sebastião	0.989	1.085	1.074	0.808	0.950	0.720
<i>Echinometra locunter</i>	São Sebastião	0.958	1.041	1.000	0.857	0.950	0.680
<i>Echinometra locunter</i>	São Sebastião	0.989	1.085	1.016	0.857	0.950	0.680
<i>Echinometra locunter</i>	São Sebastião	0.958	1.106	1.000	0.868	0.960	0.720
<i>Echinarrachnius parma</i> *	Maine (Cole, W. H.)	0.995	1.011	0.995	0.982	1.010	0.969
<i>Strongylocentrotus drobachien-</i> <i>sis</i> *	Maine (Cole, W. H.)	1.008	1.097	0.981	0.944	1.023	0.981

* Os dados foram retirados da tabela II — Cole (1. c. pp. 580).

i = meio interno
e = meio externo

Ainda levando em conta as análises de COLE (1. c., p. 578) é interessante ver que a existência de uma íntima relação por nós observada entre o teor dos líquidos cavitários e o da água do mar do local correspondente, também ocorre com os animais por êle estudados. Isto indica, ao nosso vêr, semelhança de comportamento entre animais que habitam os trópicos no norte e no sul. Analisando as tabelas vê-se que as relações iônicas conservam um certo equilíbrio entre os animais. De fato, na tabela 8 nota-se um aumento na relação Na/Cl e Mg/Cl nos animais do trópico norte compensado por uma diminuição nas relações K/Cl, Ca/Cl e SO₄/Cl. Mas, segundo COLE se estabelecermos uma relação iônica desses elementos Na, K, Ca, Mg, Cl, SO₄ no fluido cavitário e na água do mar em que vivem, poderemos tirar algumas conclusões a respeito da sua dependência desse meio e da permeabilidade das membranas.

Segundo COLE, quando as relações $\frac{Na^i}{Na^e}$ $\frac{K^i}{K^e}$ $\frac{Ca^i}{Ca^e}$ $\frac{Mg^i}{Mg^e}$ $\frac{Cl^i}{Cl^e}$

SO₄ⁱ *

— permanecem entre 0,9 e 1,1, quer dizer que há distribuição uniforme em SO₄^e ambos os meios, interno e externo. Seria, então, o caso do Na, K, Ca e Cl. Relações menores que 0,9 indicam exclusão dos ions, como no do sulfato e do magnésio para os nossos animais e relações maiores 1,1 indicam acumulação de ions relativa ao meio externo.

Com os dados da tabela 9 podemos interpretar o que ficou dito acima, sendo preciso notar que nos retirados do trabalho de COLE para essa comparação, a semelhança de seus resultados com os nossos é grande se considerarmos as relações do meio interno (líquido cavitário) e do meio externo (água do mar).

* i = meio interno
e = meio externo

T A B E L A 10
CONFRONTO DA ÁGUA DO MAR DE VÁRIAS LOCALIDADES

L O C A L	mM Cl/ litro		Clorinidade em mM/ litro														
			Na/Cl			K/Cl			Ca/Cl			Mg/Cl			SO ₄ /Cl		
	H.W.S.	W.H.C.	H.W.S.	W.H.C.	D.V./A.B	H.W.S.	W.H.C.	D.V./A.B	H.W.S.	W.H.C.	D.V./A.B	H.W.S.	W.H.C.	D.V./A.B	H.W.S.	W.H.C.	D.V./A.B
S. Sebastião	—	—	—	—	0.524	—	—	0.0289	—	—	0.0287	—	—	0.0588	—	—	0.1328
Salsbury Cove- Maine	488	492	0.861	0.931	—	0.0188	0.0173	—	0.0195	0.0197	—	0.1040	0.0687	—	0.0629	0.516	—
New York	525	—	0.859	—	—	0.0204	—	—	0.0293	—	—	0.0985	—	—	0.0609	—	—

H.W.S. = *H. W. Smith* (análises feitas por métodos descritos por *Smith* (1929) apud *Cole* (1940, p. 579).

W.H.C. = *William H. Cole* (análises feitas por *Cole* (1940 I. c. pp. 579).

D.V. e A.B. = *Domingos Valenté* e *Antonieta Bruno* (análises feitas por nós por métodos já descritos no início do trabalho).

Finalmente, se fizermos um confronto entre as águas de S. Sebastião, Salsbury Cove-Maine, New York, conforme Tab. 10, poderemos vêr que o valor da clorinidade da nossa água está entre ambas.

Quanto à relação Na/Cl, Mg/Cl, muito menores em S. Sebastião, são contrabalançadas pelas relações K/Cl, SO_4/Cl muito maiores para nossa água. A relação Ca/Cl mantem-se para S. Sebastião intermediária entre as outras duas. Mas, se compararmos os resultados dessas análises da água do mar do local de colheita dos nossos animais, com as de WEBB (1939 pp. 179-183) vemos que, tanto as relações Na/Cl, K/Cl, como a clorinidade, são

T A B E L A 11

CONFRONTO DA ÁGUA DO MAR DO CANAL DE SANTOS (S) COM A DE SÃO SEBASTIÃO (SS)

Gramas per litro

Na		K		Ca		Mg	
SS	S	SS	S	SS	S	SS	S
7.5201	7.6560	0.4576	0.3539	0.4563	0.4069	1.1200	0.9910
7.5201	7.6125	0.4576	0.3539	0.4563	0.4022	1.1200	0.9636
7.5201	7.7256	0.4840	0.3482	0.4312	0.4062	1.1200	0.9910
7.5201	7.5980	0.4840	0.3550	0.4312	0.4022	1.1200	0.9860
7.5201	7.6125	0.4576	0.3595	0.4312	0.3952	1.0850	0.9786
7.5201	7.6386	0.4576	0.3597	0.4312	0.4051	1.0850	0.9711
	7.5835		0.3533		0.3894		0.9993
	7.7057		0.3533		0.3825		0.9711
	7.7720		0.3572		0.3963		0.9877
	7.6016		0.3471		0.4022		0.9960
	7.6947		0.3527		0.4184		0.9761
	7.7256		0.3415		0.3952		0.9860
	7.7509		0.3609				
	7.6705		0.3535				
	7.6828		0.3611				
	7.6328		0.3481				
Md. 7.5201	7.6665	0.4664	0.3537	0.4395	0.3993	1.1083	0.9831
Df.	+0.1464		-0.1127		-0.0402		-0.1252

Os dados da água do mar de Santos foram retirados do trabalho de SALOMÉ PEREIRA (1945, pp. 73).

bem semelhantes. Mais um confronto poderá ser feito se observamos a Tab. 11, na qual notaremos a diferença existente entre S. Sebastião (SS) e o canal de Santos (S) em relação as quantidades de Na, K, Ca, Mg.

5 RESUMO

Os Moluscos, os Equinodermas, e os Tunicados por nós estudados apresentam permeabilidade das membranas, permitindo certa seleção de elementos minerais.

A diversidade da composição dos líquidos internos desses invertebrados decorre em parte da época da colheita e da variação das marés.

O poder seletivo das membranas é acentuado, fato que é mais evidente quando se estuda a variação iônica individual de animais da mesma espécie. Baseados nessas observações e nos resultados por nós obtidos poderemos preparar uma solução perfusora para os Equinodermas, segundo Tab. 12.

TABELA 12

SOLUÇÃO PERFUSORA PARA *Equinodermus*

gramas / litro de água destilada				
NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	MgSO ₄
23.518	1.091	1.483	1.978	2.127

Existe uma diferença bastante acentuada quanto ao teor de Na, K, Ca, Mg entre Equinodermas, Moluscos e Tunicados não obstante viverem no mesmo local. Deste fato concluímos ser diverso o poder de seletividade iônica em cada um deles, graças à qual os animais regulam a sua concentração osmótica.

TABELA 13

RESULTADOS IÔNICOS MÉDIOS

ANIMAIS		mgrs Na/100 cc	mgrs K/100 cc	mgrs Ca/100cc	mgrs Mg/100cc
Equinodermas	<i>Lytechinus variegatus</i>	672.46	51.60	57.17	79.47
	<i>Echinometra locunter</i>	772.08	60.41	44.56	107.70
	<i>Echinaster brasiliensis</i>	838.06	46.78	72.80	105.00
Molusco	<i>Aplysia</i>	521.13	48.40	35.46	58.33
Tunicado	<i>Ascidia nigra</i>	927.33	68.62	41.48	93.62

6 — SUMMARY

1. Analyses have been made of sea water from São Sebastião, of the blood of *Ascidia nigra*, and the body fluid of the the Echinoids, *Lytechinus variegatus* and *Echinometra locunter*, and the starfish, *Echinaster brasiliensis*.

2. Perfusion solutions based upon the results are proposed.

3. The sea water from São Sebastião differs from that from Santos (Table 11) and Maine, but is similar to that analysed by WEBB.

4. The Tunicates, Echinoderms and Aplysia studied show a selective permeability of membranes for certain mineral elements.

5. The concentration of mineral elements in the invertebrate body fluid apparently depends upon the time of collection and the variation in tides.

6. The capacity of the membrane to select is very great as can be seen in the individual ionic variation of Na, K, Ca, and Mg in the same species (cf. Tables 1, 2, 3, 4, 5 and 6).

7. In the Echinoderms the greatest difference in ionic concentration between body fluid and sea water is that shown by K and Mg. The concentration of K is higher in the body fluid, Mg is higher in the sea water.

8. In *Ascidia nigra* Na and K are greater in the body fluid and Ca and Mg smaller than in sea water.

9. Similar variations were observed in anionic concentration (cf. Table 7). The least variation was found in Cl, the greatest in SO₄, which is higher in sea water than in body fluid.

According to KOIZUMI (1932, p. 309) there is a special selective penetration of ions through the animal skin, that is, K is faster than Ca, Mg and Na; Cl is faster than SO₄. Such a process may explain the small quantity of SO₄ in the Echinoderms studied. The results obtained with *Lytechinus variegatus* and *Echinometra locunter* are similar to those obtained by COLE in *Strongylocentrotus drobachiensis* and *Echinarrachnius parma*. Agreement is also found in the concentration of Cl in the sea water (table 7). As found by COLE in the animals from Salisbury Cove, Maine, the ratios of Na, K, Ca, Mg and SO₄ to Cl are the same in both animal and sea water, however, our ratios differ in absolute values from those found by COLE. As the behavior of the animals from both North and South is the same, the difference in ratios must be due to latitude.

It is concluded that in a given habitat each species has its individual ionic selectivity in order to regulate its osmotic concentration.

7— BIBLIOGRAFIA

- Bethe, A. 1930 — Permeability of the surface of marine Animals. J. Gen. Physiol., v. 13, p. 437-444, New York. Bethe, A. & Berger, E. — 1931 — Variationen in Mineralbestand verschiedener Blutarten. Pflug. Arch. ges. P. ysiol., v. 227, pp. 571-584, Berlin. Bialaszewicz, K. 1933 — Contribution a l'étude de la composition minérale des liquides nourriciers chez les animaux marins. Arch. Int. Physiol., v. 36, pp. 41-53, Liège. Clark, E. P. & Collip, J. B. — 1925 — A study of the Tisdall method for the determination of blood serum calcium with a suggest modification. J. Biol. Chem., v. 63,

- p. 461-464, Baltimore. **Cole, W. H. 1940** — The composition of fluids and sera of some marine animals and of the sea water in which they live. *J. Gen. Physiol.* v. 23, pp. 575-584 New York. **Denis, W. 1922** — The determination of magnesium in blood, plasma and serum. *J. Biol. Chem.*, v. 52, pp. 411-415. Baltimore **Fredericq, L. 1901** — Sur la concentration moleculaire du sang et des tissus chez les animaux aquatiques. *Bull. Acad. Belg. Sci.*, p. 428. **Kahane, M. E. & Dumont, M. R. 1932** — Dosage du sodium dans les substances biologiques. *Bull. Soc. Chem. Biol.*, v. 14, pp. 1257-1271. Paris. **Hoffman, W. S. 1941** — Photometric Clin. & Chem., pp. 174. Apud — **Sandell, E. B. 1944**, pp. 405 in colorimetric determination of traces of metals, — Interscience publ. Inc. pp. XVI+487 New York **Koizumi, T. 1932** — Studies on the Exchange and the equilibrium of water and electrolytes in *Holothurian caudina chilensis*. *Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ.* v. 7 n. 2, Sendai, pp. 259-311. **Kolthoff, I. M. & Sandell, E. B. 1943** — Text book of quantitative inorganic analysis. 345 pp. McMillan. New York. **Krammer, B. & Gittlemann, 1924** — An iodometric method for the determination of sodium in small amounts of serum *J. Biol. Chem.*, v. 62, p. 353, Baltimore. **Krammer, B. & Tisdall, F. F. 1921** — A clinical method for the quantitative determination of potassium in small amounts of serum. *J. Biol. Chem.*, v. 46, p. 339-349, Baltimore. — **1921** — The direct quantitative determination of sodium, potassium and magnesium in small amounts of blood. *J. Biol. Chem.*, v. 48, pp. 223-232. Baltimore **Krogh, A. 1939** — Osmotic regulation in Aquatic animals. Ed. Univ. Press. 242 pp. Cambridge. **Linder, R. & Kirk, P. L. 1937** — Quantitative drop analysis. VII Further investigations on the determination of calcium. *Mikrochemie*, v. 22, pp. 291-300. Wien **Luederwaldt, H. 1929** — Resultados de uma excursão scientifica a Ilha de São Sebastião em 1925. *Rev. Mus. Paulista*, v. 16, pp. 1-80. São Paulo. **Margaria, R. 1931** — The osmotic changes in some marine animals. *Proc. Roy. Soc. B*, v. 107, pp. 606-624, London. **Okazaki, K. & Koizumi, T. 1926** — Ueber die Liebeshöhlenflüssigkeit von *Holothurien*, *Caudina chilensis* (J. Müller). *Sci. Rep. Tohoku Univ.* IV, v. 2, pp. 139-142, Tokyo. **Pantin, C. F. A. 1931** — The origin of the composition of the body fluids in animals. *Biol. Rev.*, v. 6, pp. 459-482. Cambridge. **Robertson, J. D. — 1939** — The inorganic composition of the body fluids of three marine invertebrates. *J. Exp. Biol.*, v. 16, pp. 387-397. Cambridge. — **1949-50** — Ionic regulation in some marine invertebrates. *Ibid.* v. 26 (2) pp. 182-200., Cambridge. **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, pp. 155-177. Cambridge **Salomé Pereira, R. 1945** — Estudos sobre a composição da água do mar e do soro do sangue de *Callinectes danae* Smith. *Bol. Fac. Fil. Ci. Letr. Univ. S Paulo*, Zool. n. 9, pp. 69-96. S. Paulo. **1945** — Photometric determination of potassium in biological materials. *J. Biol. Chem.*, v. 160, pp. 617-629. Baltimore. **Snell, F. D. & Snell, C. T. — 1949** — Colorimetric methods of analysis. 3a. Ed., v. 2, X+950 pp., D. van Nostrand Co. Inc. New York. **Van Slyke, D. D. & Hiller, A. 1947** — Application of Sendroy's iodometric chloride titration to protein containing fluids. *J. Biol. Chem.*, v. 167, pp. 107-124, — Baltimore **Webb, D. A. 1939** — The sodium and potassium content of sea water — *J. Exp. Biol.* v. 16, pp. 178-183. Cambridge.

