

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

RUBENS SALOMÉ PEREIRA

Docente livre da Universidade de São Paulo.

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

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

I

ÁGUA DO MAR.

Determinação do sódio.

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

o K sob a forma de $(PtCl_6)K_2$ e em deduzir da soma $CINa + ClK$ o peso do ClK calculado a partir da quantidade de $(PtCl_6)K_2$ obtida. Esse método, além de laborioso, é sujeito a erros consideráveis. Muito mais conveniente é determinar-se o Na sob a forma de acetato triplice de sódio, zinco e uranila (3-4), ou de sódio, magnésio e uranila (5-6). Piper (7) mostrou que quantidades moderadas de Cl_2Ca , de ClK , não exercem influência sobre os resultados, e que a interferência do SO_4 "só se fazia sentir no caso de o Ca achar-se presente em porção tal que a solubilidade do SO_4Ca fosse excedida. Esse método é excelente para a dosagem do sódio na água do mar, como o demonstram os resultados que adiante se vêm, particularmente à vista da alta percentagem desse metal, que nela se acha, e das quantidades, relativamente baixas em relação a êle, de potássio e de cálcio, assim como de fosfatos e de sulfatos. Nessas condições, é possível determinar-se o Na sem que haja necessidade de separação prévia de certos interferentes. A sensibilidade do método e a alta quantidade de Na permitem, além disso, que se possa diluir consideravelmente a água salgada, o que, concorrendo para abaixar ainda mais a concentração de possíveis elementos perturbadores, ainda maior segurança dá ao processo, e mais simples o torna.

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

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

MÉTODO

Reagentes:

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

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

Dissolvem-se o acetato de uranila e o de magnésio em água fervente, juntam-se o ácido acético e o álcool, deixa-se esfriar, dilue-se, por meio de água destilada, a solução obtida até 1 litro e deixa-se em repouso, em lugar fresco e escuro, durante 24 horas, pelo menos. Filtra-se por filtro de vidro de fundo poroso Jena G³, a fim de separar-se o precipitado de acetato triplice que se forma devido às impurezas que se contém nos reagentes, e conserva-se, ao abrigo dos raios solares, em frasco de vidro Pyrex, preferivelmente, e de cor escura.

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

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

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

d) **Acido acético glacial.**

A amostra de água do mar, filtrada por filtro de vidro de fundo poroso, Jena G3, dilue-se na proporção de 1:10, ou mais; da diluição tomam-se alíquotas correspondentes a 0.005-0.020 cm³ da amostra, de acôrdo com a provável riqueza da mesma em sódio, e passa-se para um tubo de centrifugação de forma cônica. Ajuntam-se 4 cm³ de (a), gota a gota e, com o auxilio de bastonete fino, de vidro, agita-se o liquido até este começar a turvar-se; agita-se ainda, até nitida formação de precipitado. Retira-se o bastonete do tubo e lava-se aquele com cerca de 1 cm³ de (a), que se ajunta ao tubo em que se efetua a precipitação. Deixa-se em repouso, em logar fresco, durante uma ou duas horas. Centrifuga-se, então, energicamente, durante cerca de 10 minutos, à velocidade de 2.500-3.000 r.p.m. e decanta-se o liquido sobrenadante. Inverte-se o tubo sôbre uma folha de papel de filtro disposto sôbre camada de algodão posta em copo de boca larga. Deixa-se escorrer bem e enxuga-se a boca do tubo com papel de filtro sem fibras. Lava-se, então, com (b). Para tanto, por meio de pipeta de extremidade de vasamento fina, injecta-se, soprando-se, cerca de 1 cm³ do liquido de lavagem e, em seguida, a fim de pôr-se todo o precipitado em suspensão, mantem-se o tubo entre o polegar e o indicador de uma das mãos, com os dedos da outra, dão-se batidas leves, rápidas e sucessivas ao longo do terço inferior do mesmo. Deixam-se escorrer ao longo das paredes mais 5 cm³ de (b), a fim de bem se lavarem as mesmas. Centrifuga-se durante cerca de 5 minutos, à velocidade indicada, decanta-se o liquido sobrenadante, inverte-se o tubo sôbre papel de filtro, como anteriormente. Lava-se o precipitado ainda duas vêzes mais e dissolve-se em água destilada quente. Passa-se a solução de acetato triplíce para balão volumétrico de capacidade conveniente e lava-se repetidamente o tubo em que se realizou a precipitação, até se perfazer cerca de 2/3 da capacidade do balão. Resfria-se o liquido à temperatura ambiente, ajuntam-se 0.5 cm³ de (d) para cada 25 cm³ de solução colorida. Faz-se ao mesmo tempo um branco dos reativos, de acôrdo com a técnica descrita, e que servirá de liquido de compensação. Determina-se a extinção dada pelo fotômetro gradual de Zeiss-Pulfrich, usando-se cuba de espessura conveniente e interpondo-se o filtro S-43.

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

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

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

em que:

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

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

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

QUADRO I

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

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

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

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

QUADRO II

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

Volume da solução colorida	Espessura da cuba usada	D	E	k
cm ³	cms			
25	0.5	55	0.230	0.520
50	1.0	56		0.252
100	2.0	55.5	0.256	0.128

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

Q U A D R O I I I

Determinação do sódio na água do mar.

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

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

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

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

Breves comentários sobre o método.

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

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

Marenzi (10), que precipita o sódio sob a forma de acetato tríplice de *Na*, *Zn* e *UO₂*, determina indiretamente o *Na* por via fotométrica, por meio da cor dada pelo ferrocianeto de potássio, emprega o fotometro de Zeiss-Pulfrich e usa o filtro S-45.

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

Determinação do potássio.

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

MÉTODO

Reagentes:

- a) Acido sulfúrico 2 N
- b) Vermelho de metila. Dissolvem-se 0.02 gr. do indicador em álcool etílico a 60% e perfaz-se o volume de 100 cm³.
- c) Carbonato de sódio. Solução saturada a frio.
- d) Cobaltinitrito de prata. Dissolvem-se 25 gr. de cobaltinitrito de sódio em 150 cm³ duma solução de nitrato de sódio em que há 50 gr. deste sal. Ajuntam-se, aos poucos, 5 cm³ duma solução de nitrato de prata a 40 gr. per 100 cm³, sob agitação consante, e dilue-se a 200 cm³ por meio de água destilada. Adicionam-se 2 cm³ de ácido acético glacial e faz-se uma corrente de ar passar pela solução até não haver mais despreendimento de gases. Coloca-se o reagente na geladeira, à temperatura de 4° - 6°; 12-24 horas mais tarde filtra-se

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

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

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

f) **Ácido clorídrico**, $d=1.19$.

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

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

A amostra de água salgada em que se vae dosar o potássio filtra-se por filtro de vidro poroso, Jena G3, e dilue-se na proporção de 1:5 ou 1:10. Da diluição toma-se aliquota correspondente a $0.02\text{-}0.10\text{ cm}^3$ da amostra e passa-se para tubo de centrifugação de forma cônica e de diâmetro reduzido na parte inferior, graduado à altura de 1.5-7.5 e 10 cm^3 . Leva-se o mesmo ao banho de ar, cuja temperatura gradualmente se eleva a $120^\circ - 130^\circ\text{C}$, e evapora-se cuidadosamente o líquido até secura. Ajuntam-se 0.5 cm^3 de (a) e de novo se evapora em banho de ar, como anteriormente. Aquece-se sobre chama pequena, cuidadosamente, para eliminar-se, de todo, o cloro presente. Esfria-se o tubo, ajuntam-se 0.5 cm^3 de água destilada e, em presença de uma gota de (b), alcaliniza-se cuidadosamente a solução por meio do reagente (c). Mergulha-se, então, o tubo em banho-maria fervente, durante cerca de 5 minutos. Se houver formação de precipitado, ou de turvação, esfria-se a solução, centrifuga-se, passa-se o líquido sobrenadante para outro tubo de centrifugação semelhante ao já usado. Dissolve-se o precipitado em algumas gotas de CH_3COOH 2 N, adicionam-se 0.5 cm^3 de água destilada, uma gota de (b) e repete-se a precipitação por meio de (c), como anteriormente. Centrifuga-se e o líquido sobrenadante decanta-se para o segundo tubo de centrifugação. A solução assim obtida ajunta-se, gota a gota CH_3COOH 5 N até desenvolver-se cor vermelha. Mergulha-se o tubo em banho-maria fervente para eliminar-se todo o CO_2 formado no processo. Se necessário, adiciona-se cuidadosamente CH_3COOH diluído, cerca de 1 N, a fim de manter-se o líquido levemente ácido, e reduz-se o volume a 1 cm^3 . Esfria-se o tubo e ajunta-se 1 cm^3 de (d). Leva-se a solução à geladeira, à temperatura de $4^\circ\text{-}6^\circ\text{C}$, e duas horas mais tarde, pelo menos, centrifuga-se durante cerca de 15 minutos, à velocidade de 2.500-3.000 r.p.m. Aspira-se o líquido sobrenadante, até ficarem apenas 0.5 cm^3 do mesmo, por meio de capilar de extremidade voltada para cima, de sorte que o precipitado não se disturbe. Ajunta-se então 1 cm^3 de água destilada, gota a gota, deixando-se o líquido correr ao longo das paredes. Formam-se, assim, duas camadas de densidade desigual: a superior, formada de solução muito diluída do reagente, e a inferior que se constitui do mesmo reagente quase nada diluído. A fim de se misturarem tais camadas sem se perturbar o precipitado, inclina-se o tubo cuidadosamente até este tomar posição quase horizontal, e rapidamente se faz o mesmo volver à posição primitiva. Repetem-se esses movimentos 3 ou 4 vezes, e em seguida, lava-se o interior do tubo com 4 cm^3 de água destilada. Centrifuga-se o líquido durante cerca de 10 minutos, à velocidade indicada, e aspira-se, como anteriormente. Repetem-se as operações de lavagem, e desta vez usa-se acetona a 50%, em lugar de água destilada. Lava-se em seguida com acetona pura. Se se tomam precauções para bem acamar-se o precipitado, pode-se, nessa altura, decantar diretamente o líquido sobrenadante sem que haja perda de precipitado. Inverte-se o tubo sobre papel de filtro posto sobre camada de algodão colocada em copo de boca larga, deixa-se que o excesso de líquido escorra bem, enxuga-se a boca do tubo com pano limpo ou com papel de filtro sem fibras. Repete-se a lavagem com acetona pura. Nesta altura o líquido deve ser inteiramente incolor e, se assim não estiver, de novo se lavará com acetona. Ajunta-se 0.1 cm^3 de (f) e leva-se ao banho de ar cuja temperatura gradualmente se eleva até $150^\circ\text{-}160^\circ\text{C}$. Depois de eliminar-se inteiramente todo o excesso de ácido, resfria-se o tubo, ajunta-se água destilada; mergulha-se o tubo em banho-maria fervente, de novo se esfria. Adicionam-se 0.5 cm^3 de (g) e 0.2 cm^3 de (h), para volume final de 10 cm^3 ; dilue-se convenientemente o conteúdo do tubo com água destilada e homogeniza-se bem a solução corada. Faz-se ao mesmo tempo, exatamente sob as mesmas condições, um branco dos reativos, que servirá de líquido de compensação. Determina-se a extinção dada pelo fotômetro gradual de Zeiss-Pulfrich, interpondo-se o filtro S-43, usando-se cuba de espessura apropriada, de sorte que a extinção, E, se situe entre 0.15 e 0.80. A leitura faz-se entre 10 e 40 minutos depois da adição dos reagentes.

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

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

em que:

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

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

Q U A D R O I V

Reprodutibilidade dos resultados

Determinação do potássio na água do mar.

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

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

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

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

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

Determinação do cálcio.

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

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

A amostra da água do mar filtra-se por filtro de vidro de fundo poroso, Jena G3, e dilue-se na proporção de 1:5 ou de 1:10. Da diluição tomam-se alíquotas correspondentes a 0.05-0.20 cm³ da amostra que se transferem para tubos de centrifugação de forma cônica, de diâmetro reduzido na extremidade inferior, graduados à altura de 5-7.5 e 10 cm, e precipita-se o cálcio exatamente como se escreveu em (14) O (COO)₂ Ca lavado, é dissolvido em ClH, tratado pelo perhydrol, e o Ca se precipita sob a forma de (PO₄)₂ Ca₃. Determina-se o P do precipitado por via fotométrica. E' aconselhável, à vista da quantidade de Mg presente na água salgada, dissolver-se o (COO)₂ Ca e reprecipitar-se o mesmo.

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

QUADRO V

Reprodutibilidade dos resultados.

Determinação do calcio na água do mar.

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

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

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

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

Determinação do magnésio

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

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

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

QUADRO VI

Determinação do magnésio na água do mar.
Reprodutibilidade dos resultados.

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

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

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

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

Determinação do fósforo.

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

Dois a 20 cm³ da amostra filtrada por filtro de vidro de fundo poroso, Jena G³, põem-se em tubo de vidro "Pyrex" de tamanho conveniente, graduado à altura de 10 cm³ e evaporam-se até pequeno volume. Ajuntam-se, então, tantos cm³ de SO₄H₂ 10 N quantos os necessários para transformar os sais presentes em sulfatos e para deixar a solução ácida, de normalidade às voltas de 0.1-0.4 N. Aquece-se a solução sobre chama pequena, cuidadosamente, até formação de abundantes vapores ácidos. Esfria-se o tubo, dilue-se por meio de água destilada, até cerca de 8 cm³ e desenvolve-se a cor conforme o método citado.

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

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

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

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

Q U A D R O V I I

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

II

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

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

A determinação dos elementos minerais foi realizada em duas fases:

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

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

O sôro obtido é medido em pipeta de Kahn e transferido quantitativamente para um tubo de vidro Pyrex, ou preferivelmente, de quartzo, graduado à altura de 1, 2, 2,5 e 5 cm³ em que se acham 0,5 cm³ de água destilada. Lava-se repetidamente a pipeta com o líquido que se encontra no tubo, ajunta-se 1 cm³ de mistura nitro-perclorica (NO₃H d = 1,40 e ClO₄H d = 1,67 na proporção de 3:1) e aquece-se no banho de ar cuja temperatura se eleva gradualmente a cerca de 145°C. A solução ácida ferve calmamente e os vapores de óxidos de azoto se eliminam. No caso de o líquido enegrecer-se, ajuntam-se quantidades exatamente medidas da mistura ácida e de novo se aquece como anteriormente, até obter-se solução incolor, ou levemente amarelada. Aumenta-se, então, vagorosamente, a temperatura até cerca de 205°C. Depois de conseguir-se residuo incolor, ou de leve amarelado, eleva-se a temperatura até às alturas de 250°C, de modo a eliminar-se todo o excesso de ácido perclórico. Aquece-se, então, o tubo mais vigorosamente, à chama dum bico de Bunsen, e o aquecimento se continúa até destruição total dos percloratos e cessação completa de despreendimento de vapores. O residuo dissolve-se, com o auxilio do calor, se necessário, em quantidade tal de ClH 0,1 N que a acidez da solução, depois de se haver feito volume final conveniente com água destilada, se situe às voltas de 0,05 N. Faz-se, ao mesmo tempo, exatamente sob as mesmas condições, um "branco". Da solução das cinzas obtida, tomam-se alíquotas para a dosagem dos vários elementos, e idênticas porções se tomam do "branco" para fins de compensação.

Determinação do sódio. Da solução clorídrica das cinzas medem-se partes correspondentes a 0,005-0,020 cm³ de sôro, passam-se para tubos de centrifugação, de forma cônica, que se aquecem cuidadosamente no banho de ar, elevando-se aos poucos a temperatura, a cerca de 120-130°C, até evaporação total do líquido. Gradualmente se alteia a temperatura até às volas de 150°-160°C e de todo se elimina o excesso de ácido. Esfriam-se os tubos e o residuo que nêles se encontra dissolve-se em 0,5 cm³ de água destilada. Nesta solução determina-se o sódio de acôrdo com o método indicado.

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

Determinação do cálcio. Depois de se isolarem os metais precipitáveis pela oxina em meio ácido (pH = 4,5-5,3), o cálcio é dosado como se descreve em (14).

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

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

Resultados.

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

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

No quadro VIII, a composição dos sôros não corresponde à análise de animal por animal: a fim de obter-se maior quantidade de material, sangrava-se número variável de animais, misturavam-se as hemolinfas obtidas e da mistura se preparava o soro. A apreciação dos resultados, porém, levou-nos a abandonar esse modo de proceder. Verificações cuidadosas dos métodos expostos convenceram-nos de que, mesmo no caso de se conseguir apenas 0.1 cm³ — e às vèzes até um pouco menos — de soro, era possível dosar satisfatoriamente os elementos estudados. Os quadros que se seguem ao VIII, referem-se ao soro obtido de indivíduo por indivíduo.

QUADRO VIII

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

Soro resultante da mistura da hemolinfa de vários animais.

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

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

Soro n.º	Sangue de	Na		K		Ca		Mg		P
		mgr. per 100 cm ³	m.eq.per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m.eq.per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m.eq.per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m.eq.per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³
1	4 ♀	681.21	296.22	40.57	10.38	36.88	18.40	39.89	32.80	11.37
2	2 ♀	1033.13	449.25	45.83	11.72	39.45	19.19	40.71	33.48	6.04
3	2 ♀	940.69	409.05	26.15	6.69	31.75	15.84	23.61	19.42	5.40
4	1 ♀	935.25	406.68	29.93	7.66	42.39	21.15	22.11	18.18	6.83
5	3 ♂ 2 ♀	935.25	406.68	33.97	8.69	45.59	22.75	33.57	27.61	6.50
6	2 ♂ 3 ♀	853.69	371.22	28.04	7.17	41.12	20.52	32.97	27.11	7.28
7	11 ♀	543.75	236.44	34.62	8.86	43.38	21.65	30.88	25.39	7.62
8	11 ♀	578.55	251.58	31.34	8.02	40.22	20.07	34.36	28.26	8.24
9	10 ♂	799.95	334.80	38.62	9.88	33.35	16.64	22.31	18.35	4.22
10	1 ♂	683.31	297.13	48.53	12.41	51.81	25.85	37.85	31.13	6.64
11	4 ♂	635.10	276.17	42.89	8.41	41.16	20.54	39.84	32.76	2.77
MÉDIA		789.99	343.51	35.50	9.08	40.65	20.28	32.55	26.77	6.63

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

Amostra

Composição da água do local da colheita dos animais

I 394,00 171.33 16.17 4.14 11.08 5.53 20.14 16.56

QUADRO IX

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

Sêro obtido pela sangria de animal por animal.

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

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

Sêro n.º	Sexo	Na		K		Ca		Mg		P
		mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³	100 cm ³ mgr. per	m. eq. per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³	
1	♂	1046.17	454.92	50.20	12.84	58.00	28.94	39.96	38.86	2.69
2	♀	972.66	422.95	51.73	13.23	60.10	29.99	39.05	32.11	2.36
3	♀	990.06	430.52	51.24	13.11	61.23	30.55	39.24	32.27	2.69
4	♀	957.00	416.14	49.68	12.71	58.45	29.17	38.90	31.99	2.42
5	♀	990.06	430.52	50.66	12.96	61.98	30.93	38.35	31.54	2.17
6	♀	973.22	423.19	50.66	12.96	61.58	30.73	38.99	32.06	2.39
7	♀	978.27	425.39	51.05	13.06	59.00	29.44	39.90	32.81	2.48
8	♀	936.12	407.06	48.53	12.41	57.70	28.79	38.35	31.54	2.55
9	♀	930.90	404.79	40.55	10.37	50.83	25.36	38.60	31.74	—
10	♀	1006.05	437.47	51.22	13.10	59.19	29.54	42.66	35.08	—
11	♂	1042.26	453.22	40.66	10.40	71.03	35.44	38.64	31.78	—
12	♂	984.07	427.91	38.69	9.90	47.80	23.85	38.40	31.58	—
13	♀	991.80	431.27	44.00	11.25	61.58	30.73	38.93	32.01	—
14	♀	991.80	431.27	42.35	10.83	68.00	33.93	42.99	35.35	—
15	♂	967.87	420.87	41.91	10.72	62.00	30.94	40.66	33.41	—
16	♂	1013.55	440.73	42.46	10.86	71.63	35.74	43.41	35.70	—
17	♂	1079.04	469.21	39.32	10.07	68.00	33.93	38.18	31.40	—
		991.23	431.03	46.17	11.81	61.06	30.47	39.71	32.66	

Amostra

Composição da água do local da colheita dos animais

III

1063.51 462.46 44.21 11.31 26.80 13.37 132.73 109.15

QUADRO X

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

Sêro obtido pela sangria de animal por animal.

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

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

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

Sêro n.º	Sexo	Na		K		Ca		Mg	
		mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³
1	♂	984.68	428.18	55.16	14.11	22.36	11.16	57.72	47.47
2	♀	1209.71	526.03	59.46	15.21	45.08	22.50	58.32	47.96
3	♀	1127.96	470.43	47.18	12.07	24.69	12.32	47.76	39.28
4	♀	1102.65	479.48	54.65	13.98	24.50	12.23	58.89	48.43
5	♀	907.32	394.54	38.52	9.85	33.81	16.87	49.09	40.37
6	♀	1040.84	452.60	53.26	13.62	31.90	15.92	65.74	54.06
7	♀	1065.32	463.24	53.26	13.62	45.08	22.50	76.64	63.02
		1062.64	462.08	51.64	13.21	32.48	16.21	59.17	48.66

Amostra

Composição da água do local da colheita dos animais

IV

756.65 333.37 35.37 9.05 19.93 10.93 98.31 80.85

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

QUADRO XI

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

Soro obtido pela sangria de animal por animal.

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

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

Soro n.º	Na		K		Ca		Mg	
	mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³
1	1028.80	447.36	57.62	14.74	72.43	36.14	48.01	39.48
2	1164.90	506.54	57.71	14.76	71.90	35.88	47.21	38.82
3	1165.80	506.94	59.09	15.11	69.24	34.55	54.45	44.78
4	1170.15	508.83	60.24	15.41	74.63	37.24	55.28	45.46
	1132.41	492.41	58.67	15.01	72.05	35.95	51.24	42.14
Amostra	Composição da água do local da colheita dos animais							
V	853.30	371.05	60.00	15.35	50.00	24.95	111.55	91.74

QUADRO XII

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

	Na		K		Ca		Mg	
	mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³	mgr. per 100 cm ³	m. eq. per 1000 cm ³
I — Média da composição de todos os soros analisados (Quadros VIII, IX, X e XI).....	961.77	418.22	45.42	11.62	51.30	25.60	42.36	34.84
II — Média da composição dos soros obtidos de indivíduo por indivíduo (Quadros IX, X e XI).....	1029.25	447.58	49.32	12.62	55.49	27.68	46.22	38.00
III — Média da composição dos soros dos indivíduos sangrados no local da colheita (Quadros IX e XI)	1018.12	442.72	48.55	12.42	63.16	31.52	41.90	34.46

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

Soluções perfusoras para *Callinectes danae* Smith.

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

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

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

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

SUMMARY

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

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

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

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

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

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

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

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

BIBLIOGRAFIA

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

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

