# Variaciones químicas de los ácidos nucleicos de semillas de *Pinus pinea*, durante la estratificación en frío

por

M. SANZ MUÑOZ y E. PALACIOS ALAIZ

Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, C. U., Madrid

SUMMARY

Nucleic acids (RNA and DNA) in *Pinus pinea* seeds have been detected and estimated.

Cold stratification initiates an increase of RNA reaching the highest level after fifteen days, remaining constant through the stratification. Concomitantly with the increase of RNA the level of proteins also increases in the same way.

Thiamin in stratified seeds increases even more the level of RNA.

The increase in DNA during cold stratification is little significant.

En este trabajo se prosigue la línea de investigación iniciada hace unos años en nuestro laboratorio y en la cual se han ido estudiando las variaciones químicas que se producen en las semillas de *Pinus pinea* (6, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 11) durante su estratificación en frío y germinación.

En esta comunicación tratamos de identificar RNA y DNA en estas semillas y sus variaciones cuantitativas durante la estratificación en frío. No vamos a encarecer la importancia y transcendencia de ambos compuestos porque de todos es sabido la parte tan activa que desempeñan en la transmisión de los caracteres hereditarios y en la biosíntesis de proteínas.

El trabajo está orientado en primer lugar en la aplicación de métodos de valoración a ácidos nucleicos puros para conocer su grado de pureza y que nos puedan servir luego de patrones y simultáneamente disponer de técnicas adecuadas para la identificación y valoración en semillas de *Pinus pinea*.

## A) Parte experimental

### 1. *Material empleado*

Se ha utilizado semilla de *Pinus pinea* (pino piñonero) procedente de Coca (Segovia) con capacidad germinativa del 95 por 100, suministrada por el Servicio de Semillas Forestales del Ministerio de Agricultura.

Se utilizaron semillas sin estratificar y estratificadas durante períodos de tiempo de tres días; una, dos, tres y cuatro semanas, y uno, uno y medio, dos, tres y cuatro meses.

La estratificación se realizó poniendo capas alternantes de semillas con otras de vermiculita previamente humedecidas con agua o con una solución acuosa de tiamina (40 mg/100 c. c.), sin estar aquellas unas en contacto con las otras y a temperatura constante de 4° C.

Los ácidos nucleicos se pueden valorar por su contenido en pentosas (ribosa o desoxirribosa), por el fósforo o por su absorción al U. V. en 260 nm. Como quiera que para su valoración es imprescindible compararlos con patrones de grado de pureza muy grande, es necesario en primer lugar analizar aquellos. Nosotros hemos hecho las determinaciones con RNA y DNA procedentes de la casa Calbiochem, que respondieron a un suficiente grado de pureza. Por otra parte, siendo compuestos macromoleculares que según su origen de obtención pueden variar en su polimerización y por ende en su peso molecular efectuamos las determinaciones directamente y en los casos de valoración por las de pentosas, después de hidrolizados.

### 2. *Curva patrón de desoxirribosa*

Para la preparación de las curvas standard, según Burton (3), se utilizó desoxirribosa Light. La difenilamina y ácido acético usados como reactivos se deben destilar antes del uso. Se hicieron curvas patrón para 2-18 µg y 20-36 µg. Las transmisiones se practicaron a 600 nm. (en aparato Bausch & Lomb Spectronic 20), después de veinte horas a 37° C y también después de ebullición de diez minutos. Aunque con pequeñas diferencias en ambos tipos de manipulación dio mejores resultados el primero, por cuyo motivo es el que se empleó. Ambas curvas siguen la ley de Beer.

### 3. *Curva patrón de ribosa*

Se siguió el método de Brown (2), modificación del de Dische (5). El orcinol se debe recristalizar dos veces en benzol para obtener buenos resultados. La solución patrón empleada fue de 40 µg/c. c. de ribosa, y las concentraciones empleadas entre los límites de 10-80 µg. Las lecturas a 660 nm. (fotocolorímetro Klett-Summerson). La gráfica obtenida sigue la ley de Beer.



### 4. *Curva patrón de fósforo*

Se siguió el método de Grisewold (8), modificación del de Fiske-Subbarrow (7). El 1-amino-2-naftol-4-sulfónico se debe de purificar según estos últimos autores (7). La solución patrón empleada contenía 50 µg. Las lecturas se efectuaron a 660 nm. en fotocolorímetro Klett-Summerson. La gráfica resultante sigue la ley de Beer.

### 5. *Determinación de desoxirribosa, ribosa y fósforo en problemas*

En cada una de ellas basta sustituir el patrón por el problema a la concentración adecuada y operar de la misma forma.

### 6. *Pureza del patrón DNA*

Para todas las determinaciones posteriores, en los líquidos de extracción de los piñones se empleó DNA ex salmón sperm de Calbiochem como patrón porque por los análisis químicos efectuados y por su estudio al U. V. que se reseña después lo revelan como de gran pureza.

#### 6.1. *Determinación cuantitativa de DNA por su contenido en desoxirribosa*

La determinación se efectuó por la técnica referida anteriormente en muestras de soluciones acuosas de DNA y soluciones de DNA hidrolizadas con sulfúrico 5 N, ácido perclórico al 75 por 100 y sosa 0,1 N. Los tratamientos sulfúrico y alcalino se practicaron en baño de agua hirviente durante una hora. La hidrolisis con ácido perclórico se ejecuta a llama directa. La solución acuosa de DNA se prepara interponiendo el DNA exactamente pesado y agregando la cantidad mínima de amoniaco hasta solución total.

Los mejores resultados se obtuvieron hidrolizando con sulfúrico 5 N con un rendimiento de 104 por 100 de la desoxirribosa hallada con respecto a la calculada. Los valores medios de los cuatro procedimientos los incluimos en la tabla I.

### 6.2. *Determinación de DNA por su contenido de fósforo y nitrógeno*

Para el primero se utilizó el procedimiento de Grisewold y para el segundo un microkjeldahl. Los resultados en la tabla I.

TABLA I

| % en DNA | Teórico | Hallado | Rendimiento |
|---|---|---|---|
| Desoxirribosa..... | 28,20 | 26,25 | 94,50 |
| Fósforo ..... | 8,13 | 8,12 | 99,87 |
| Nitrógeno..... . | 10,09 | 10,16 | 100,60 |

### 6.3. *Curvas de absorción del patrón DNA*

El contenido de desoxirribosa, N y P corresponden prácticamente al teórico, lo que nos indica su alto grado de pureza. Por eso determinamos su curva de absorción en la región 200 y 300 nm. para identificar su máximo en 260 nm. y su mínimo en 230 nm. Los experimentos fueron los siguientes:

1. Determinación directa en solución acuosa (40 µg/c. c.). 2. Después de hidrolizar con $ClO_4H$ 0,5 N a 70° C durante quince minutos. 3. Después de hidrolizar con $ClO_4H$ 0,5 N a 70° C durante cuarenta minutos. 4. Después de hidrolizar a 35° C durante dieciséis horas.

La curva de absorción del DNA en solución es la clásica con un máximo en 260 nm. y con un mínimo en 230 nm. Con los tratamientos con perclórico se efectúan ligeros desplazamientos del máximo y del mínimo. Por otra parte, la hidrólisis contribuye a aumentar las densidades ópticas de los máximos, incrementándose aquellas con el tiempo de calefacción (tabla II).

### 6.4. *Curvas patrón de absorción para la determinación de DNA*

Las curvas patrón para su determinación posterior en semilla de *P. pinea* se efectuaron a 260 nm. entre 1-6 y 10-60 µg para DNA en solución acuosa. Entre 6,66 µg/$c_3$ c.-66,66 µg/c. c. para DNA



hidrolizado con ácido perclórico N/1 a 70° C durante quince minutos y entre 3-10 µg/c. c. y 10-80 µg/c. c. Todas ellas siguieron perfectamente la ley de Beer.

TABLA II

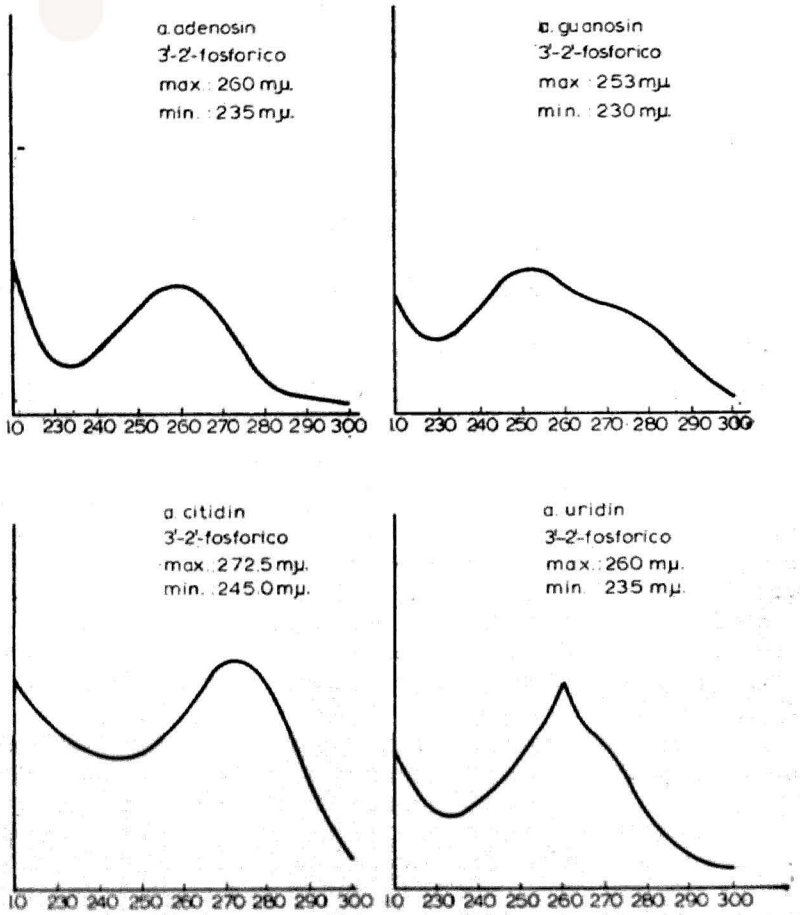
| Experimentos | Máximo nm | d. o. | Mínimo nm | d. o. |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 260 | 0,750 | 230 | 0,352 |
| 2 | 265 | 0,985 | 232,5 | 0,489 |
| | 265 | 1,07 | 232,5 | 0,533 |
| 4 | 267 | 0,900 | 230 | 0,360 |

### 7. *Ensayos de recuperación de mononucleótidos y RNA por el método de adsorción*

Como de todo el mundo es conocido que las proteínas interfieren en la determinación de los ácidos nucleicos por su absorción en 280 nm. y a las fracciones extraídas de los piñones no se las puede privar totalmente de ellas, intentamos comprobar en primer término si de simples soluciones acuosas de varios mononucleótidos y de RNA se pueden recuperar éstos y si se modifican sus máximos y mínimos de absorción, para así después poder utilizar este método con las fracciones obtenidas de las semillas de *P. pinea*.

El método está basado en realizar una adsorción con carbón activo, filtrar, y después de eluir con piridina, privar o eliminar ésta con cloroformo y, por último, evaporar éste al vacío. Nosotros apreciamos anormalidades en el trazado de las curvas de absorción debidas sin duda a los restos de disolvente, aunque se hubiese hecho la destilación y evaporación al vacío. Estas anormalidades se vencieron disolviendo los residuos en agua y después liofilizando. En los residuos liofilizados y disueltos en agua se determinaron las densidades ópticas entre 200 y 300 nm. para trazar las respectivas curvas de absorción (gráfica 1). Las soluciones tratadas fueron las siguientes:

18,4 mg. de ácido adenosinfosfórico disueltos en 10 c. c. de agua
20,9 » » guanosinfosfórico » » » » » »
20,4 » » citidín-fosfórico » » » » » »
12,0 » » uridinfosfórico » » » » » »
29,4 » » ribonucleico » » » » » »




**Gráfica 1**

Las diluciones para poder después efectuar las lecturas fueron de 1/100. En la tabla siguiente se consignan los máximos y mínimos de los cuatro mononucleótidos en solución acuosa y posteriormente de su recuperación por intermedio de carbón activo. Podemos apreciar un ligero desplazamiento en los máximos, siendo especialmente significativo el del RNA de 260 a 255 nm.



TABLA III

*Curvas de 220-300 nm.*

| | En solución acuosa | | Despues del tratamiento | |
|---|---|---|---|---|
| | Máximo | Mínimo | Máximo | Mínimo |
| Acido adenosín 3'—2' fosfórico... | 260 | 235 | 260 | 240 |
| Acido guanosín 3'—2' fosfórico .. | 253 | 230 | 250 | — |
| Acido citidín 3' - 2' foafórico..... | 272,5 | 245 | 270 | 250 |
| Acido uridín 3'—2' fosfórico ..... | 260 | 235 | 250 | 240 |
| Acido ribonucleico ..... | 260 | 230 | 255 | no neto |

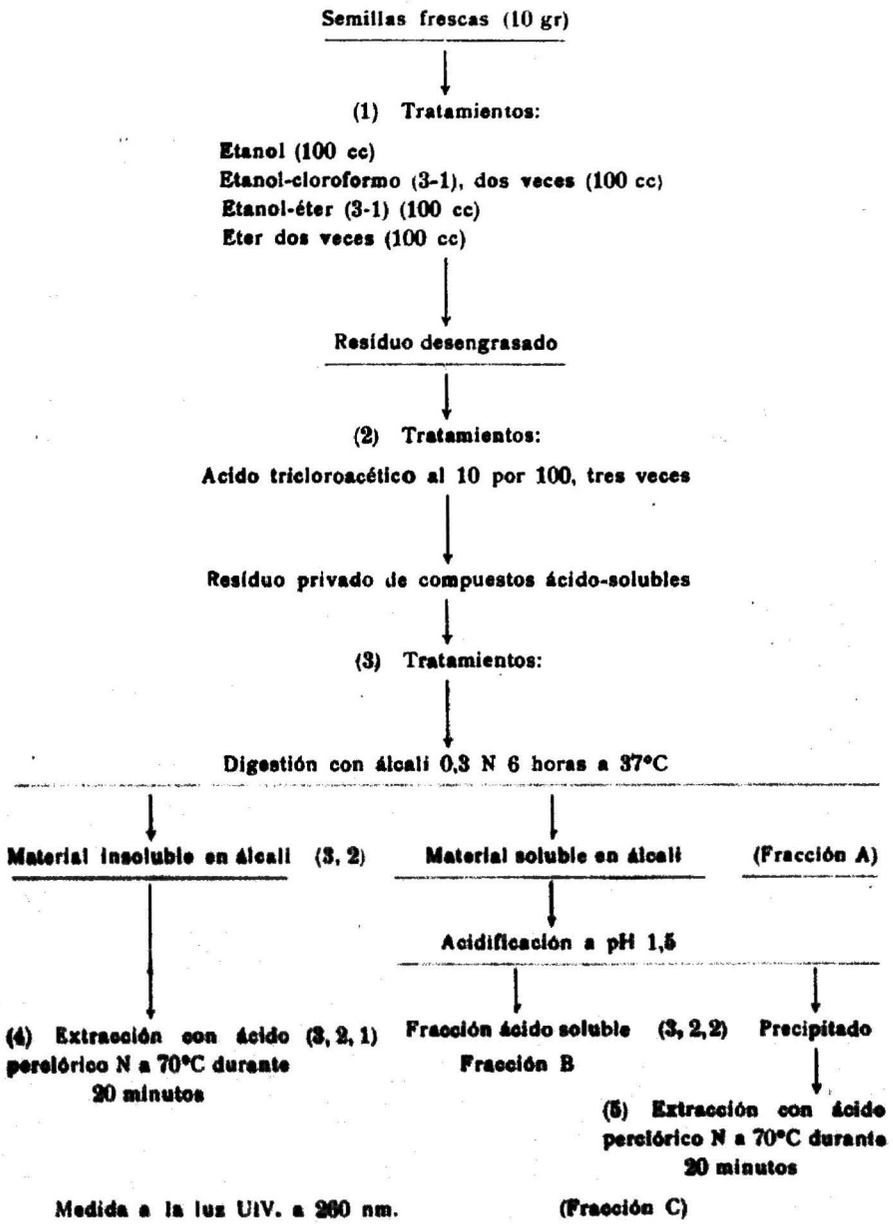
## 8. *Extracción de las fracciones A, B y C*

La extracción para la obtención de los extractos en los que se determinan RNA y DNA se puede efectuar según diversos procedimientos, entre los cuales destacan los clásicos de Schmidt-Tannhauser (19), Ogur-Rosen (13) y Schneider (20). Según Hutchinson y Munro (10 y 12), aunque estos métodos son objecionables el más conveniente es el de Schmidt-Thannhauser, por cuya razón es el que hemos seguido y en el cual hemos introducido leves modificaciones, por ejemplo en lugar de tratar primero con ácido tricloroacético y después eliminar los lípidos lo hemos verificado al contrario por tratarse de una semilla muy oleosa. La eliminación de los lípidos en frío, como se realiza en este procedimiento, es total, confirmado por nosotros cuantitativamente en comparación con el método de extracción en Soxhlet, y teniendo en cuenta las humedades respectivas de las muestras.

Respecto de la digestión alcalina con álcali 0,03 N, que ha sido objeto de discusión respecto al tiempo de incubación, nosotros comprobamos en repetidas ocasiones que el período óptimo de incubación es el de seis horas.

El proceso de extracción se podría representar esquemáticamente como sigue:

**ESQUEMA GENERAL DE EXTRACCION (según Schmidt-Thannhauser)**






En este método de extracción, aun cuando se han seguido básicamente las normas dadas por Schmidt-Thannhauser, vamos a incluir algunas indicaciones de las manipulaciones efectuadas por nosotros, ya que las peculiaridades de la semilla de *P. pinea* nos obligó a vencer dificultades e interferencias que se presentaban durante el proceso de extracción y posteriormente en la ejecución de las medidas en la luz U. V. Por ello comentaremos y haremos observaciones siguiendo el orden del esquema general de extracción.

Para eliminar la grasa, según el apartado 1 del esquema, se parte alrededor de 10 gr. de piñones (privados de la cáscara) exactamente pesados y se trituran con 100 c. c. de etanol enfriado a 0° C y dejan en maceración doce horas en nevera. Se centrifuga a 10.000 r.p.m. y el residuo se extrae y centrifuga sucesivamente con los disolventes del esquema enfriados previamente a 0° C. Las centrifugaciones se deben realizar en centrifuga refrigerada.

El residuo desengrasado se tritura y trata con ácido tricloracético enfriado según el apartado 2, y deja en nevera a 0° C toda la noche para que los líquidos que queden sean transparentes al filtrar a la trompa. El lavado del residuo se verifica hasta no dar reacción ácida de tricloracético; queda privado así de compuestos ácidos solubles. La digestión alcalina de este residuo se efectúa según el apartado (3). La recogida del material insoluble del álcali (3,1) y precipitado (5,2) conteniendo DNA se efectúan por filtración a la trompa, y los extractos de los apartados 4 y 6 y fracción (5,1) se llevan cada uno a volumen conocido.

A la fracción 3,2 la denominamos Fracción A (que contiene RNA + DNA), a la 3,2,1 (que contiene RNA), Fracción B, y a la 5 (que contiene DNA), Fracción C.

La composición cualitativa de las tres fracciones en piñones sin estratificar y estratificada cuatro meses son entre sí muy semejantes. Las fracciones $A_{SE}$ y $A_{E_4M}$ dieron reacción positiva intensa de grupos fenílicos (reacción xantoproteica) de biuret positiva intensa y de aminoácidos azufrados y de triptofano positivas. Negativa de azúcares libres, reductores.

Las fracciones $B_{SE}$ y $B_{E_4M}$ dieron las mismas reacciones, excepto aminoácidos azufrados. Las fracciones $C_{SE}$ y $C_{E_4M}$ como las de A.

En estas fracciones se determinó el fósforo correspondiente a ácidos nucleicos y fosfoproteínas y los prótidos a 50 nm. (método de Lowry (11)), con los siguientes resultados (tabla IV):

Por los resultados anteriores se comprueba la existencia de prótidos, que por otra parte aumentan con la estratificación de las semillas; esto lleva consigo que puedan interferir en la determinación de los ácidos nucleicos si se trata de valorarlos por su absorción a la luz U. V. Por ello nosotros aplicamos el método de adsorción con

TABLA IV

| | Fósforo mg/100 gr de peso seco | Prótidos mg/100 gr de peso seco |
|---|---|---|
| Fracción $A_{SE}$ ... | 113,04 | 1,34 |
| Fracción $B_{SE}$ ... | 46,27 | 1,00 |
| Fracción $C_{SE}$ ... | 59,40 | 0,03 |
| Fracción $A_{E_4M}$ .. | 68,92 | 12,23 |
| Fracción $B_{E_4M}$ .. | 50,16 | 8,65 |
| Fracción $C_{E_4M}$ .. | 15,23 | 6,80 |

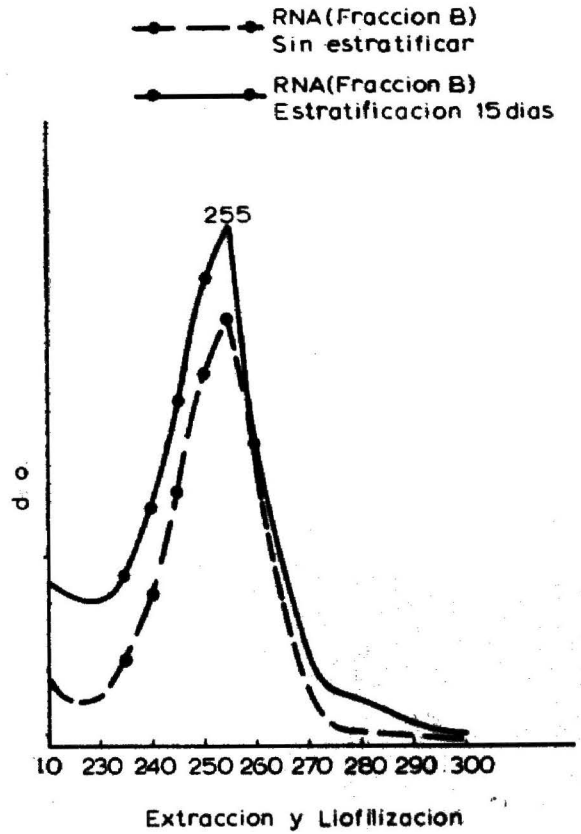
carbón activo, elución y liofilización final, para después el residuo de la liofilización disolverlo en agua y determinar las curvas de identificación entre 220-300 nm. en las fracciones siguientes: B y C (gráficas 2 y 3), procedentes de semillas sin estratificar y estratificadas quince días, y en la fracción A, procedente de semilla estratificada tres meses. Indefectiblemente todas presentan un máximo bien definido y neto en 255 nm. y un mínimo en 230 nm., el cual se halla desplazado en algunos casos como ocurre en las fracciones B sin estratificar, B y C estratificados quince días, que en algunas extracciones se halla en 230, en otras en 240 o por debajo de 220 nm.

Las curvas de absorción son las genuinas de ácidos nucleicos por sus máximos y mínimos. El hecho de que el máximo se halle desplazado a 255 nm. es consecuencia del método empleado, así como el desplazamiento del mínimo, como ya tuvimos ocasión de comprobarlo con el RNA y ácido guanosin 3-5 fosfórico patrones, en los cuales también se desplaza el máximo en el primero y el mínimo en el segundo.

Por otra parte, y para comprobar que las curvas obtenidas corresponden a mononucleótidos procedentes de RNA hidrolizado, y no a mononucleósidos, se identificó el fósforo por el método de Allen (1) en los líquidos de las fracciones que sirvieron para obtener tales curvas resultando en todos positivas la reacción. La reacción del Biuret fue siempre negativa; como además las absorciones en 270 nm. decrecientes hasta 300 nm. son muy pequeñas, se pueden considerar prácticamente exentas de proteínas.

(*) Hemos descartado los métodos de valoración por medio del contenido de ribosa y desoxirribosa, porque los colores obtenidos eran tan sucios y poco significativos que resultaban inaceptables.






Gráfica 2

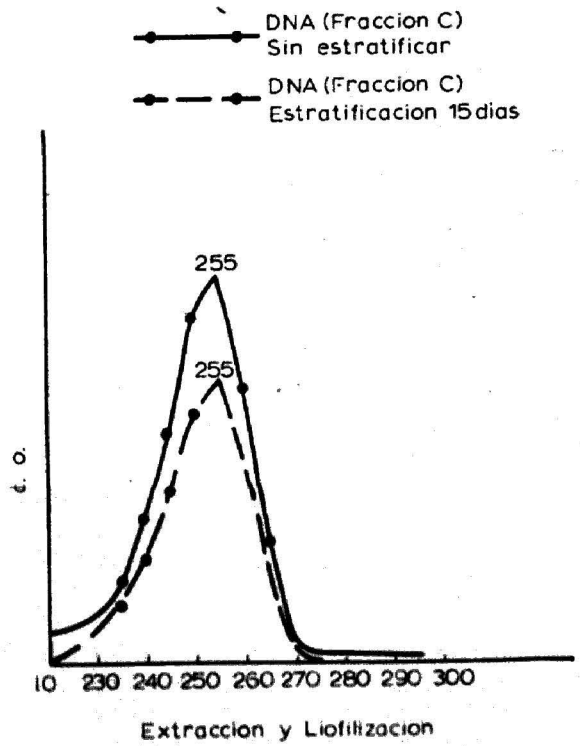
Quedaba la duda de si la máxima absorción en 255 nm. de estas curvas pudiesen ser responsables la tirosina o el triptofano, que absorben fuertemente en el U. V. Por ello hallamos unas curvas de absorción de la tirosina en medio de ácido perclórico a pH 0,6 antes y después de liofilizar y de triptofano igualmente a pH 1,8. Los máximos y mínimos permanecen inalterables por liofilización, siendo para la primera 275 nm. respectivamente y 245 nm. y para el segundo 280 nm. y 245 nm.

Con estas curvas (gráficas 2 y 3), en comparación con otras patrón de RNA y DNA y por las densidades ópticas de sus máximos, intentamos efectuar la determinación cuantitativa de sus respectivos ácidos

nucleicos y nos salieron unos valores extremadamente altos del orden de 500-1.000 mg/100 gr. de peso seco.

### 9. *Determinación cuantitativa de RNA y DNA*

Para la determinación cuantitativa (*) empleamos curvas obtenidas de las fracciones A, B o C, cuyos líquidos desproteinizábamos adicionando una solución acuosa de sulfato amónico a saturación a partes iguales (1v : 1v) y filtrando después. Estas curvas de estos

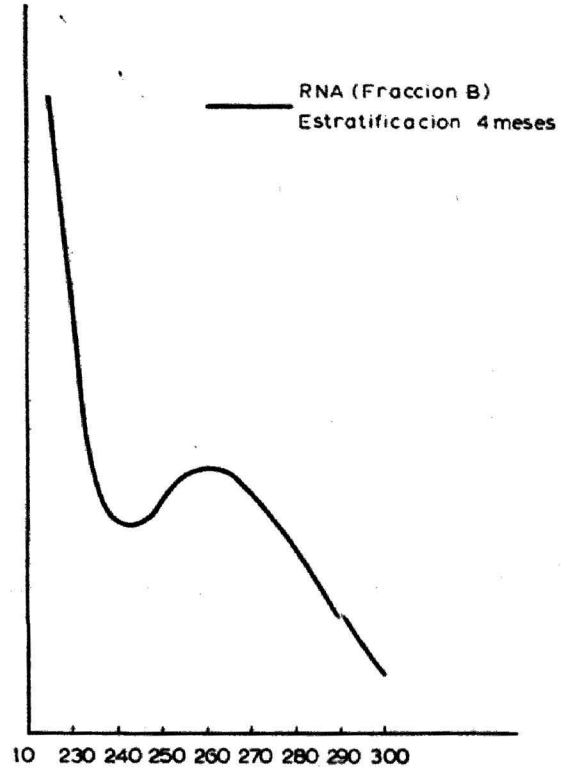



**Gráfica 3**

líquidos a media saturación resultaban siempre con el máximo en 260 nm., aunque el mínimo algo desplazado, generalmente, a 240 nm. (gráfica 4). El cálculo de los contenidos de RNA y DNA en las semillas de *P. pinea*, partiendo de cada una de las tres fracciones, se realizó por medio de la diferencia entre las d. o. (densidades ópticas), a 260 nm. (máxima absorción de los RNA y DNA) y 280 nm. (absorción de las proteínas).



Los resultados referidos a peso seco se consignan en la tabla V y gráfica 5.



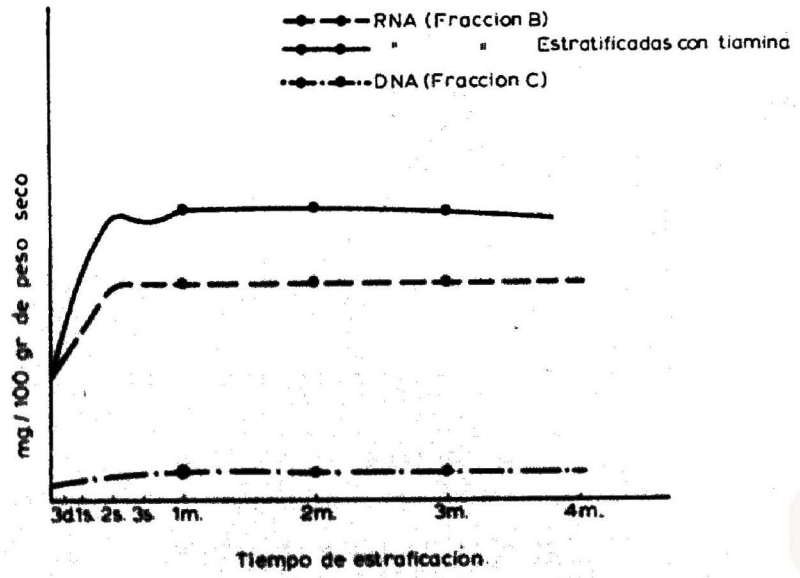

**Gráfica 4**

## B) Discusión de los resultados

Los métodos fundamentados en la valoración de ácidos nucleicos, por medio de la pentosa, presentan el inconveniente de que las reacciones coloreadas en que se basan no son claras cuando se hacen con las fracciones A, B y C del proceso de extracción, según Schmidt y Thannhauser, a consecuencia de materias que interfieren.

TABLA V

| mg/100 gr de peso seco | Sin estratificar | Estratificadas con agua | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 3 d | 1 s | 2 s | 3 s | 1 m | 2 m | 3 m | 4 m |
| RNA (Fracción B) | 27,96 | | 37,90 | 49,36 | 49,45 | 49,58 | 49,71 | 49,63 | 50,00 |
| DNA (Fracción C) | 2,19 | | 2,51 | 2,92 | 3,01 | 3,06 | 3,02 | 3,07 | 3,00 |
| | Sin estratificar | Estratificadas con solución acuosa de tiamina | | | | | | |
| RNA (Fracción B) | 27,96 | 37,90 | 53,00 | 65,90 | 62,80 | 66,52 | 66,62 | 65,40 | |




Gráfica 5

La determinación por medio de su contenido en fósforo la rechazamos porque nos daban valores discordantes y además no comparables con los obtenidos por absorción a la luz U. V. En efecto, las fosfoproteínas y ácidos nucleicos habrían probablemente de seguir distintas trayectorias metabólicas durante la estratificación (**), y ambos se hallan en mezcla, en las fracciones, lo que hacía muy difícil discriminar cuál era el fósforo procedente de los ácidos nucleicos y cuál el provinente de las fosfoproteínas, y por consiguiente valorarlo.



El método de determinación utilizado por absorción al U. V. presenta el inconveniente de la interferencia que producen las proteínas por su absorción en la región de 280 nm. Por las reacciones practicadas y por los datos que se obtuvieron (tabla V), se deducía que las fracciones A, B y C contenían prótidos de bajo peso molecular, que podían interferir en las determinaciones. Por ello empleamos el método de extracción (fracción B) con piridina y liofilización final y trazamos las curvas (gráficas 2 y 3), en las cuales de manera constante se hallaba un máximo en 255 nm. Los líquidos de extracción mediante este tratamiento se encontraban prácticamente privados de las proteínas de bajo peso molecular o polipéptidos existentes antes del mismo, lo que se demuestra no sólo porque no dan las reacciones de los mismos sino por la baja absorción en la región 270-300 nm., que se manifiesta en las curvas subsiguientes. En la parte experimental queda demostrado que la absorción de estas curvas corresponden a RNA o a mononucleótidos procedentes de él por la hidrólisis alcalina, y que el desplazamiento del máximo de 260 a 255 nm. es inherente al método de extracción, puesto que esto mismo ocurre cuando se somete RNA en solución acuosa, al mismo tratamiento de extracción. Los contenidos de RNA referidos a peso seco de piñones, calculados mediante estas curvas, eran tan sumamente elevados (del orden de 500-1.000 mg/100 gr. de peso seco) y no concordantes, que no nos hemos explicado todavía lógicamente la causa, por eso hemos efectuado los cálculos mediante las curvas obtenidas directamente entre 230-300 nm. en las diversas fracciones B y C (gráfica 4). Para ello es necesario restar de la absorción en 260 nm. (d. o.) la absorción en 280 nm. (d. o.) correspondiente a la parte polipeptídica, como hacen Humphey y Kellerman (21), entre otros. Otros autores utilizan la diferencia entre 260 y 290 nm. Aunque con este artificio no se consigue eliminar totalmente la absorción del polipéptido, no obstante es un procedimiento eficiente para poder seguir con bastante exactitud las variaciones durante la estratificación.

Por último, durante la estratificación se verifica un significativo incremento de RNA hasta las dos semanas, manteniéndose después constante. Este comportamiento del RNA corre paralelo con la bio-

(**) Hecho después comprobado: los ácidos nucleicos aumentan (tabla V) y la suma de fosfoproteínas y ácidos nucleicos disminuye (tabla IV), y por ende las fosfoproteínas disminuyen.

síntesis de las proteínas, que se comportan de idéntica manera durante la estratificación, como ya demostramos en otro trabajo. Es digno de anotar también que el máximo nivel a las dos semanas no es sólo propio de ambos, sino también del ácido ascórbico, riboflavina y tiamina, entre otros componentes de la semilla estudiados por nosotros. Y es que parece que a este tiempo de estratificación es cuando más exaltado se halla el metabolismo seminal.

## Referencias


(1) Allen, R. J. L.: 1940, Biochem. J., **34**, 858.
(2) Brown, D. M., Fried, M. y Todd, A. R.: 1955, J. Chem. Soc., **2206**.
(3) Burton, K.: 1956, Biochem. J., **62**, 315-323.
(4) Cherry, J. H.: 1962, Plant Physiology, **37**, 670-678.
(5) Dische, Z.: 1949, J. Biol. Chem., **181**, 379.
(6) Figueroa, S., Sanz, M. y Giménez, A.: 1970, XII Reunión Nacional de la Soc. Esp. Ciencias Fisiol., Santiago de Compostela, 259.
(7) Fiske, C. H. y Subbarrow, Y.: 1925, J. Biol. Chem., **66**, 375-400.
(8) Grisewold, B. L., Hümoller, F. L. y Mc Intyre, A. R.: 1951, Analitycal Chemistry, **23**, 192.
(9) González, S., Cascales, M. y Santos Ruiz, A.: 1970, XII Reunión Nacional de la Soc. Esp. Ciencias Fisiol., Santiago de Compostela, 253.
(10) Hutchinson, W. C. y Munro, H. N.: 1961, The Analyst, **86**, 768-813.
(11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A, L. y Randall, R. J.: 1951, J. Biol. Chem., **193**, 265.
(11') Mayor, F.: 1966, An. Real Acad. Farm., núm. 3, 273-294.
(12) Munro, H. N. y Fleck, A.: 1966, Analyst., **91**, 78-88.
(13) Ogur, M. y Rosen, G.: 1950, Archs. Biochem., **25**, 262.
(14) Ortiz, J. M., Cascales, M. y Santos Ruiz, A.: 1970, XII Reunión Nacional de la Soc. Esp. Ciencias Fisiol., Santiago de Compostela, 257.
(15) Sanz, M., González, P., Giménez, A. y Santos Ruiz, A.: 1969, Proceeding of XIIth International Congress of Refrigeration, Madrid, 1049-1062.
(16) Sanz Muñoz, M. y Giménez Solves, A.: 1970, An. Real Acad. Farm., **36**, número 3, 434-447.
(17) Sanz Muñoz, M. y Palomino Díaz, P.: 1970, An. Bromatología, **22**, 63-80.
(18) Sanz Muñoz, M., Palacios Alaiz, E. y Santos Ruiz, A.: 1971, XIIIth International Congress of Refrigeration, I.I, núm. 3, Washington (en prensa).
(19) Schmidt, G. y Thannhauser, S. J.: 1945, J. Biol. Chem., **161**, 83.
(20) Schneider, W. C.: 1945, J. Biol. Chem., **161**, 83.
(21) Humphey, G. F. y Kellerman, G. M.: 1955, Austral. I. Exp. Biol. Med. Sci., **33**, 297.


# Contribuição ao estudo das *Characeae* para o combate à esquistossomose

por

LAIR REMUSAT RENNO

Profesor titular de Botânica do Inst. Ciencias Biológicas da UFMG

Há alguns anos venho me dedicando ao estudo de uma alga de água doce —*Chara vulgaris* L.—, família *Characeae*, ordem *Charales*, divisão *Charophyta*, dotada de propriedades exterminadoras do caramujo da esquistossomose, cujos estudos, pesquisas e experimentos, apresento como modesta contribuição, para o equacionamento de um dos maiores problemas de sanitarismo, que é a erradicação dos temíveis planorbídeos intermediários do grande mal.

Não preciso salientar a importância que representa a esquistossomose e as funestas consequências trazidas à humanidade, dizimando povos e destruindo civilizações. No Brasil, as estatísticas aí estão gritantes, denunciando a situação calamitosa em que nos encontramos, em face do elevado número de pacientes portadores dessa doença.

Não conhecemos efetivamente sua terapêutica, apenas apalpamos um terreno movediço, escorregadio, quando não enveredamos para o empirismo, como último recurso, na aplicação de princípios de origens várias e de ação mal definida.

O que pretendemos é apontar um método profilático para o desarraigamento da terrível moléstia, com o extermínio de seus elementos vetores, o caramujo, *Biomphalaria glabrata* Say, por um processo que consideramos dos mais simples porque se baseia num combate biológico, numa luta pela existência, num processo de seleção natural, na lei do mais forte.

Pesquisando e estudando a flora limnética da Reprêsa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, observei também o comportamento dos caramujos da esquistossomose, antes abundantes naquela Reprêsa. Basta dizer que no início da Reprêsa (1939) a ocorrência dos caramujos era tamanha, que 99 % das pessoas que se banharam naquelas águas contaminaram-se da esquistossomose.

Das pesquisas realizadas sôbre a presença do caramujo, 1952-1954, verifiquei, depois de percorrer tôda a margem da Reprêsa, a ausência absoluta dêsses planorbídeos, pois nenhum só encontrei em todo o perímetro percorrido daquela formação hidrográfica, sabendo entre-