

SUBSTÂNCIAS REGULADORAS DE CRESCIMENTO EM
RIZOMA DE *CYPERUS ROTUNDUS* L.

II — Natureza e propriedade do inibidor.

Marico Meguro

SUBSTÂNCIAS REGULADORAS DE CRESCIMENTO EM RIZOMA DE *CYPERUS ROTUNDUS* L.

II — Natureza e propriedades do inibidor.

MARICO MEGURO

Departamento de Botânica da Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras da Universidade de São Paulo.

INTRODUÇÃO

Experiências preliminares demonstraram a ocorrência de um ou grupo de inibidores de germinação e crescimento no rizoma de *Cyperus rotundus* L. Essas experiências foram realizadas usando-se extrato bruto de rizoma em água ou éter, provavelmente uma mistura complexa de diversas substâncias (Meguro, I — no prelo). O presente trabalho procura estudar a natureza e as propriedades desse inibidor, afim de que possam ser elucidados os mecanismos de ação e sua relativa importância no desenvolvimento da própria planta e no de outras, principalmente nas de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

1 — Preparação do extrato bruto:

- a — Rizomas de *Cyperus* foram colhidos, lavados e imediatamente congelados.
- b — O material congelado foi pesado e macerado no liquidificador. O pH foi mantido neutro ou acidificado (pH 3).
- c — A extração foi feita usando-se álcool etílico ou éter recém-distilados, durante 20 horas, a $\pm 3^{\circ}\text{C}$. 4 tipos de extratos foram obtidos:
 - extrato alcoólico do material neutro;
 - extrato alcoólico do material acidificado;

- extrato em éter do material neutro;
 - extrato em éter do material acidificado.
 - d — A proporção material/solvente foi de 100g/200ml.
 - e — Os extratos obtidos foram concentrados a baixa pressão e à temperatura nunca superior a 55°C em extratos alcoólicos e sempre inferior a 37°C em extratos em éter. O volume final foi 1/20 do volume do solvente utilizado.
- 2 — Purificação por meio de cromatografia em papel ascendente.
- a — O papel utilizado foi Whatman nº 1 previamente lavado em solvente.
 - b — Os solventes utilizados foram: n-butanol: amônia: água :: 100 : 3 : 18, n-butanol: ácido acético: água :: 4 : 1 : 1, Isopropanol: amônia: água :: 8 : 1 : 1 (de uso mais freqüente no presente trabalho).
 - c — A aplicação do extrato bruto no papel foi feita em pontos de 10 ul cada, em série, com espaçamento de 0,5 cm. Após secagem perfeita, o papel era colocado em um cilindro contendo o solvente e o conjunto mantido na câmara escura à temperatura de 22-23°C. Quando a frente do solvente atingia cerca de 30 cm de altura, o cromatograma era retirado e sêco à temperatura ambiente por ventilação.
- 3 — Localização da substância ativa no cromatograma:
- a — o cromatograma era dividido em 10 seções, paralelamente à base. Partes dessas seções contendo 3 pontos (30 ul do extrato) eram colocadas sobre lâminas de vidro ou vidro de relógio, adicionadas de água e levadas aos testes biológicos. Paralelamente era preparado um cromatograma controle seguindo-se o mesmo processo, tendo como única diferença a de conter aplicações de éter puro (ou álcool) em vez de extrato. Seções correspondentes desse cromatograma controle foram levadas aos ensaios biológicos.
- 4 — Absorção na luz Ultra violeta:
- a — o cromatograma foi examinado com uma lâmpada de luz U.V. (Mineral light-AVS-11, 115V, 60 cycles, 0,12A)

com especial atenção sôbre a faixa ativa nos ensaios biológicos.

- b — o Espectrofotômetro Zeiss — PMQ-II foi usado para a determinação da curva de absorção da substância ativa. Para êsse fim, o cromatograma foi dividido em 10 faixas, cada uma delas eluida com éter, concentrada, recromatografada e novamente eluida em alcool etílico a 95%. Uma segunda eluição do material cromatografado foi feita em HC1 0,1 N. O controle (branco) utilizado para a determinação da curva foi obtido a partir de um cromatograma corrido em branco cujas faixas correspondentes foram eluidas, recromatografadas e novamente eluidas em alcool etílico a 95% ou em HC1 0,1 N.

5 — Ensaios biológicos utilizados:

- a — Teste de crescimento com cilindros de coleoptiles de aveia (*Avena straight-growth test*). Sementes de aveia (*Avena sativa* var. IAS-2 — Instituto Agrônômico do Sul Pelotas, R. Grande do Sul) foram postas para germinar em placas de Petri revestidas com papel de filtro umedecido, a 25°C. Após 72 horas, cilindros ou seções de coleoptiles foram preparados segundo a metodologia descrita em publicações relativas a fitohormônios (Leopold, 1955; Wain and Wightman, 1956; Pilet, 1961). Tais cilindros, em grupos de 10, foram colocados em pequenos tubos contendo ou não extrato de *Cyperus* e medidas de crescimento efetuadas após 20 horas.
- b — *Teste de Oryza* — o teste de aveia acima citado, embora fornecesse resultado razoável em experiências com extrato bruto concentrado, não apresentou sensibilidade suficiente no caso de pequenas quantidades cromatografadas. Êsse fato nos levou à procura de um outro ensaio biológico adequado para o estudo da substância presente no extrato de *Cyperus*. Havia sido verificado no trabalho anterior (Meguro, I — no prelo) que raízes de plantas tratadas com o extrato mostravam forte inibição no desenvolvimento de pêlos absorventes, sendo a *Oryza sativa* var.

agulha dourada, uma das mais sensíveis. Baseado nêsse fato, foi elaborado o “Teste de *Orysa*” descrito a seguir: Sementes de *Orysa sativa* var. agulha dourada foram embebidas em água destilada durante 2 horas e postas para germinar em placas de Petri revestidas com papel de filtro (9 cm de diâmetro) umedecido com 2ml de água. Após 72 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, foram selecionadas plantinhas cujas raízes primárias apresentavam 0,5 cm de comprimento. Grupos de 5 plantinhas cada foram colocados sôbre vidros de relógio revestidos com papel de filtro (3 cm de diâmetro) embebido com determinada quantidade de extrato ou éter puro (controle para solvente) e umedecido com 0,5ml de água destilada após perfeita evaporação do solvente. Os conjuntos assim preparados eram colocados em câmaras úmidas (placas de Petri revestidas com papel de filtro umedecido) e estas mantidas em estufa de temperatura constante ($25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$), no escuro.

— Teste de *Orysa* na localização da faixa ativa do cromatograma — O cromatograma era dividido em 10 faixas paralelas à base e seções de 3x4 cm cada preparadas. Estas eram colocadas sôbre vidros de relógio e adicionadas de 0,5ml de água destilada. Dispostas as plantinhas de arroz sôbre as preparações, os conjuntos eram mantidos em câmaras úmidas, à temperatura constante ($25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$). Como controle eram usadas seções correspondentes de cromatograma preparado com aplicação apenas do solvente (éter puro).

— As medidas eram efetuadas após 20 horas e para isso, cada plântula era fixada sôbre uma lâmina de vidro com um pouco de vaselina sólida. Com o auxílio de um microprojeter Bausch and Lomb, a raiz primária e os pêlos absorventes eram projetados e os contornos desenhados numa fôlha de papel. Obtida uma série de desenhos, os comprimentos dos pêlos absorventes eram medidos em alturas determinadas da raiz.

- 6 — Ensaio químicos utilizados para a identificação da substância inibidora. Cromatogramas cujas faixas ativas eram demarcadas previamente com o auxílio de uma Lâmpada de luz U.V., foram tratados com as seguintes soluções de reagentes:
- a — Reagente de Ehrlich (Smith, 1960)
 - b — Reagente ácido oxidante (Smith, 1960)
 - c — Reagente de van Urk (Stahl, 1965)
 - d — Reagente de Prochazka (Stahl, 1965)
 - e — Reagente de ácido sulfanílico (Smith, 1960)
 - f — α -nitroso β -naftol (Smith, 1960)
 - g — Reagente de ácido nítrico — nitrito (Smith, 1960)
 - h — Ácido nítrico-etanol (Stahl, 1965)
 - i — Ácido sulfúrico-etanol (Stahl, 1965)
 - j — Ninhidrina-ácido acético (Smith, 1960)
 - l — Ninhidrina-piridina (Smith, 1960)
 - m — Reagente de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (Smith, 1960)
 - n — Reagente de nitrato de prata-alcalino (Smith, 1960)
 - o — 2,6-diclorofenol-indofenol (Smith, 1960)
 - p — Verde de bromo cresol (indicador) (Stahl, 1965)

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

- 1 — Eficiência dos solventes na extração do inibidor. Alcool etílico a 96% e éter recém distilados foram usados para a extração de rizomas previamente congelados, macerados e acidificados (pH3) ou neutros.

Segundo os resultados apresentados na tabela n.º 1 obtidos através do teste de crescimento em cilindros de coleóptiles de aveia, o solvente éter é o que se mostrou mais eficiente na extração do inibidor, tanto do material neutro como do acidificado. A porcentagem de inibição em relação ao controle (éter puro) foi de 65,5% no primeiro e 65% no segundo. O álcool foi inferior ao éter. Talvez, nesse caso, outras substâncias que não inibidores tenham sido extraídas em maior quantidade.

TABELA N.º 1

Extrato	% de inibição
En	65,5
Ea	65,0
An	52,3
Aa	28,3

0,1 ml de extrato bruto concentrado (100g/200ml e reduzido a 1/20 do vol. inicial) em álcool 96% (A) e em éter (E). Material neutro (n) ou acidificado (a).

Para a verificação da sensibilidade das coleoptiles de aveia à substância em questão, foram testadas várias diluições do extrato bruto: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256. Como foi mencionada na parte da metodologia, as coleoptiles não se mostraram bastante sensíveis. Somente as duas concentrações iniciais (1/1 e 1/2 do extrato 100g/200ml, reduzido a 1/20 do volume inicial) causaram inibição significativa no crescimento. Nenhum caso de estímulo de crescimento foi verificado.

O teste de Orysa por nós elaborado apresentou, por sua vez, os resultados expostos na tabela n.º 2.

TABELA N.º 2

Extrato	% de inibição
En	83,4
Ea	68,4
An	75,0
Aa	66,7

Teste de Orysa. 0,1 ml de extrato bruto em álcool (A) e em éter (E). Material neutro (n) e acidificado (a).

O extrato em éter do material neutro apresentou, claramente, maior efeito inibidor no crescimento dos pêlos absorventes, seguido de extrato em álcool (n).

Por outro lado, pôde ser estabelecida uma curva de proporção-

nalidade entre a concentração do extrato e o crescimento dos pêlos absorventes no limite das seguintes concentrações: 1/1 — 1/2 — 1/4 — 1/8 — 1/16 — 1/32 — 1/64. Fig. nº 1)

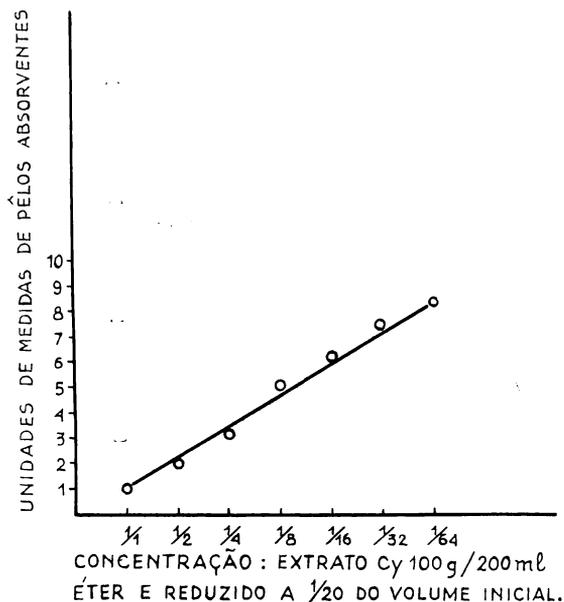


Fig. 1 — Curva de proporcionalidade entre a concentração do extrato de *Cyperus rotundus* e o crescimento dos pêlos absorventes de *Oryza sativa* var. agulha dourada (Teste de Orysa).

2 — Separação cromatográfica: — em todos os solventes utilizados, a substância inibidora apresentou Rf alto, entre 0,8 — 1,0. Em isopropanol: amônia :: 8 : 1 : 1, o Rf determinado foi em torno de 0,9 (Figura nº 2).

A localização da substância ativa foi feita com uma lâmpada de luz U.V. e confirmada por meio de teste de Orysa (Figura nº 3). As plântulas de arroz colocadas sobre a faixa ativa apresentaram, além da inibição no crescimento da raiz primária, uma notável redução nos pêlos absorventes. As demais faixas do cromatograma não mostraram efeitos palpáveis no crescimento das plântulas.

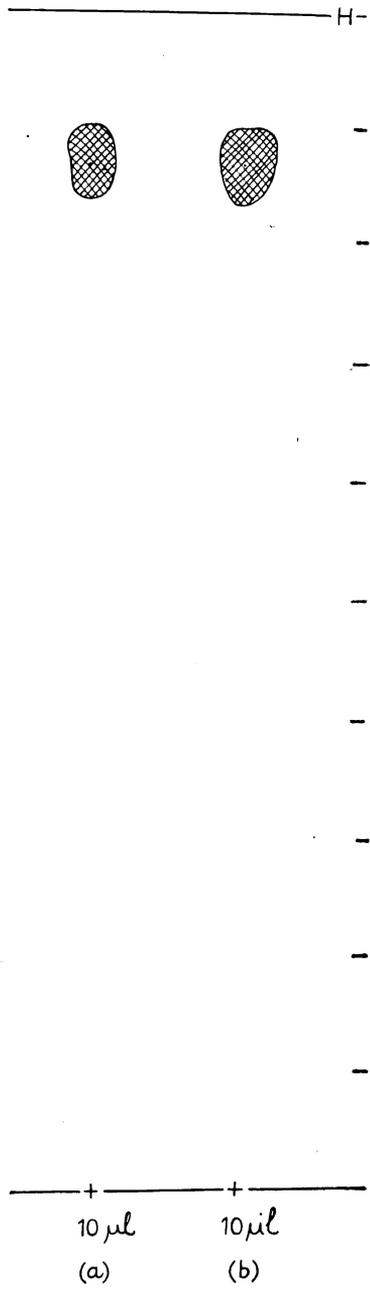


Fig. 2 — Cromatograma em papel, ascendente, com aplicação de 50 μ l de extrato bruto de *Cyperus* (em 5 pontos de 10 μ l cada). Faixa ativa localizada com lâmpada de luz U.V. e confirmada com teste de *Oryza*. Note-se a redução de pêlos absorventes principalmente na faixa 9.

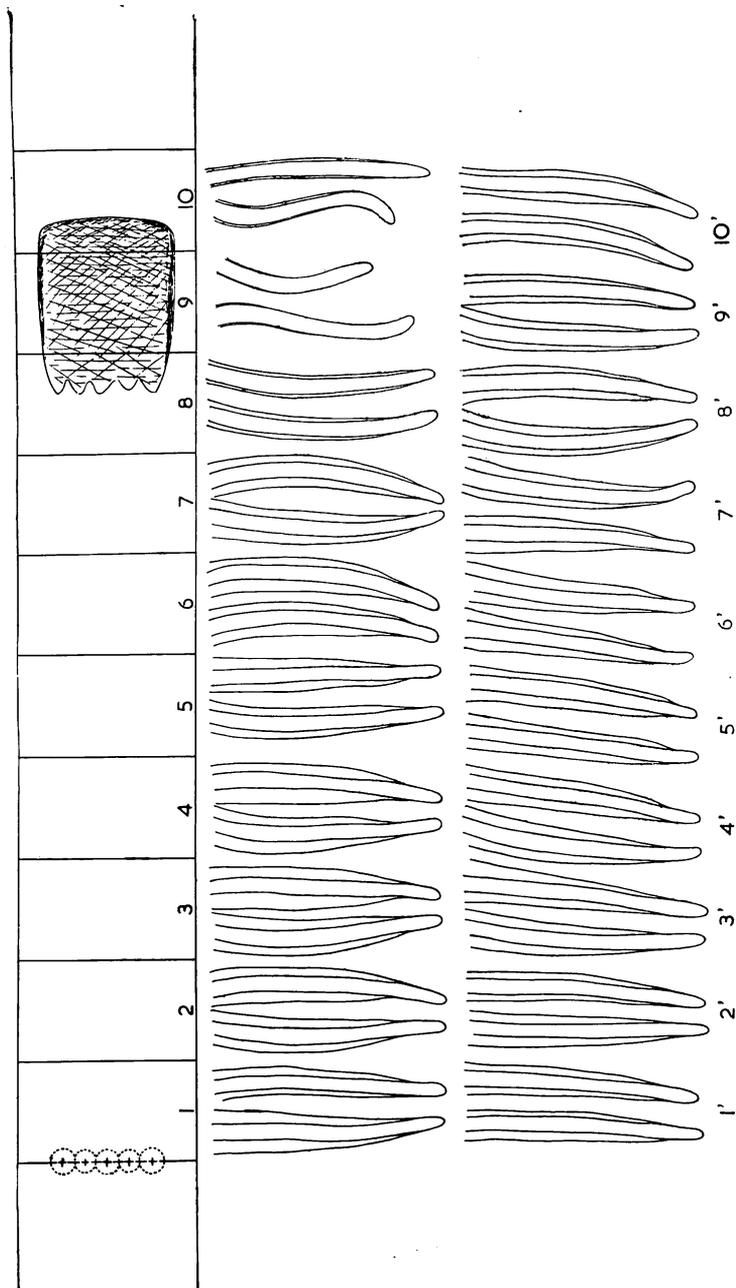


Fig. 3 — Localização do inibidor no cromatograma. Solvente utilizado = Iso-
 propanol: Amônia: Água :: 8:1:1. (a) = 10 ul de extrato bruto.
 (b) Extrato cromatografado, enluido em HCl 0,1 N e recromatografado.

3 — Curva de absorção na luz U.V. — a substância ativa eluída em álcool 96% ou em HCl 0,1 N e examinada ao espectrofotômetro Zeiss apresentou absorção na faixa compreendida entre 210-300 μ , com um máximo em tórno de 245-247 μ (Figura n.º 4). Foram verificadas, nas mesmas condições, curvas de absorção de substâncias como escopoletina, cumarina (Figura n.º 5), ácido 3-indolil acético (Figura n.º 6) e triptofano. Tôdas apresentaram curvas de absorção cujos máximos divergiam do inibidor presente no extrato.

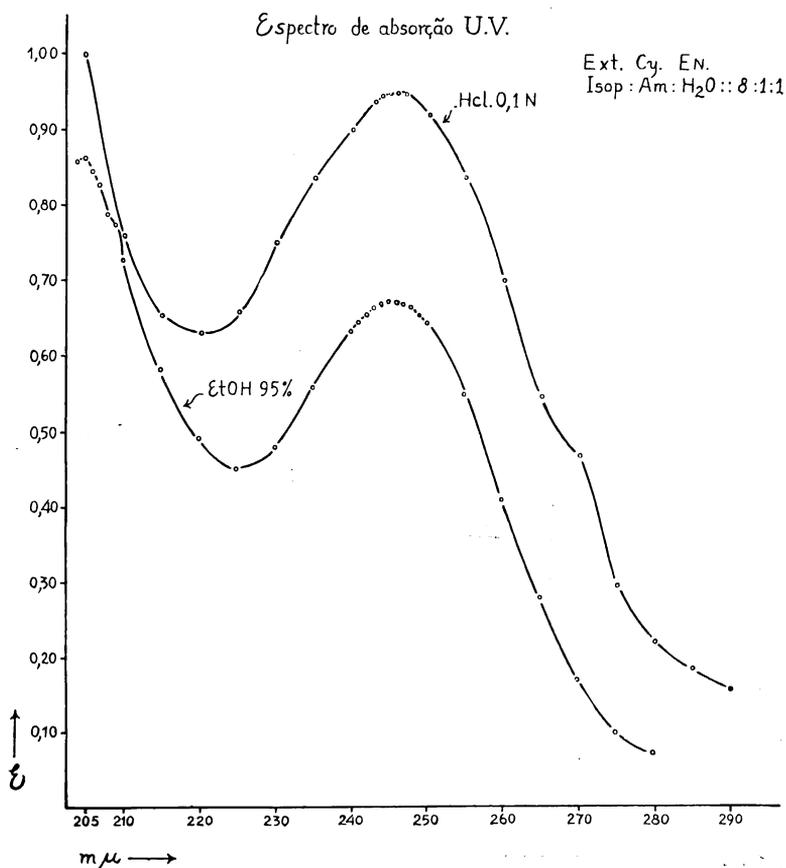


Fig. 4 — Espectro de absorção do extrato de *Cyperus* cromatografado e eluído em álcool etílico a 95% ou em HCl 0,1 N.

4 — Estudo da natureza do inibidor por meio de ensaios químicos. Os resultados de tratamento da faixa ativa do cromatograma com diversos reagentes estão expostos na tabela n.º 3 e indicam que, possivelmente, a substância inibidora do extrato de *Cyperus* pertence ao grupo dos compostos indólicos. O reagente de Ehrlich (a), embora não seja absolutamente específico aos núcleos indólicos, apresentou uma rápida reação a frio dando coloração rosa-violeta, o que é um bom indício de que a substância tratada seja um composto indólico (Smith, 1960).

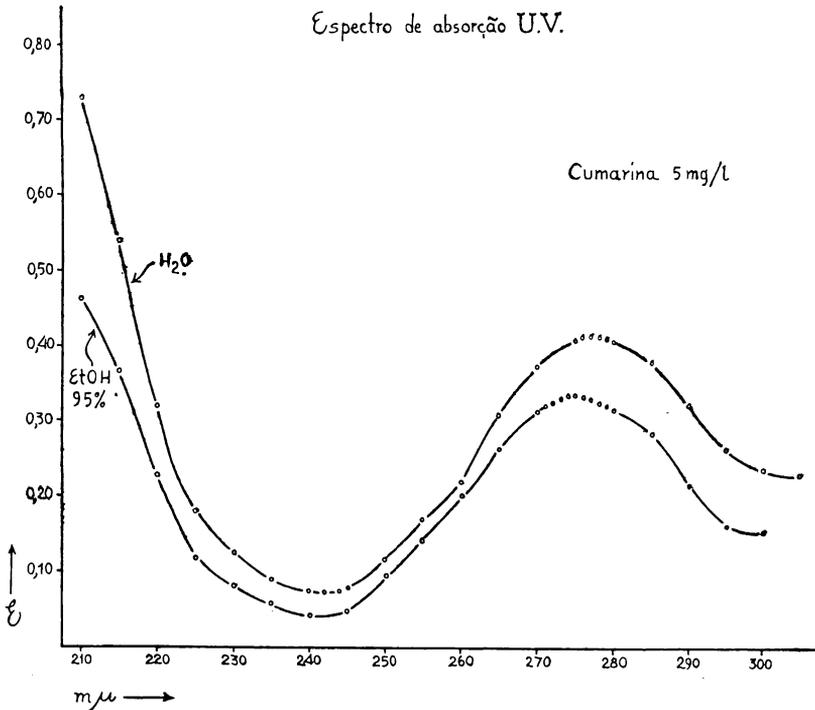


Fig. 5 — Espectro de absorção de Cumarina a 5 mg/l em álcool etílico a 95%.

Além disso, os resultados de tratamento com outros reagentes (b, c, d, e, f, g) reforçam o do reagente de Ehrlich.

Sendo o R_f da substância em estudo, aproximadamente 0,9 (ou R_f x 100 = 90) em Isopropanol: amônia: água e Buta-

nol: acético: água, foram circunscritos alguns compostos indólicos de Rf semelhantes para fins de comparação (Tabela n.º 4, extraída da tabela n.º 9. 2-Smith, 1960). Os ácidos fenólicos como Benzóico, Cinâmico, Cafeico, Ferúlico, Clorogênico apresentam Rf mais baixos em Isopr. Amônia (Smith, 1960). Lactonas insaturadas como cumarinas apresentam Rf mais baixos que a substância inibidora presente em *Cyperus*, além de comportamentos diferentes em face aos diversos reagentes, absorção na luz U.V. e fluorescência. A substância em investigação adsorvida no papel não fluoresce (absorve na luz U.V.)

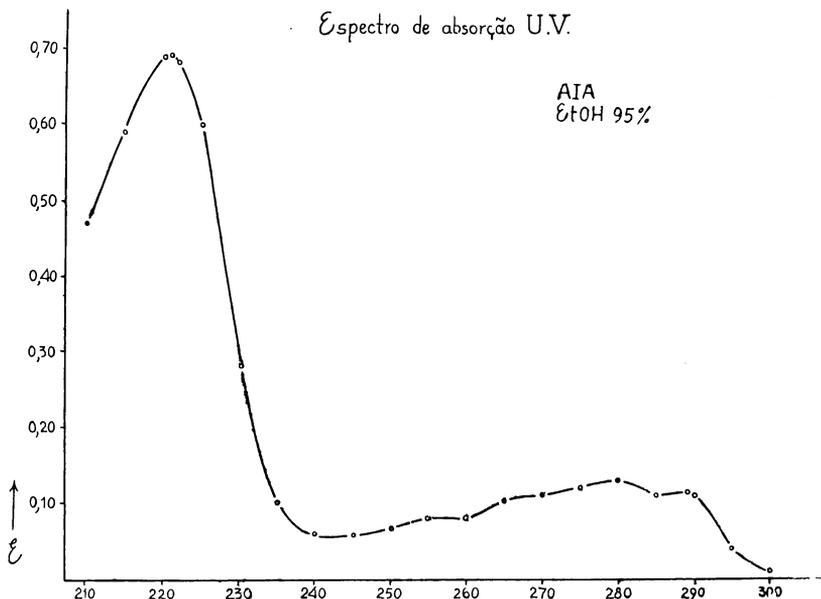


Fig. 6 — Espectro de absorção de AIA a 5 mg/l em álcool etílico a 95%.

a não ser após submetida ao tratamento com determinados reagentes (vide tabela n.º 3). Dos compostos indólicos cujos Rf se aproximam do Rf da substância, talvez possamos afastar Indolil-acetonitrila (reag. g) e 3-Indolil-aldeído (reag. m). A reação para Hidroxi-indóis (5 OH-reag. f) deu resultado positivo, assim como para aminas aromáticas (a, b, n, i). Rea-

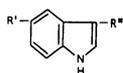
TABELA N.º 3

Reagentes	Especif. do reagente	Result. obtid. com Cy	Luz U.V.	Observações
Ehrlich	(a) Indóis = rosa-púrp.; OH-indóis = róseo (imediat.); rosa-azul; aminas aromáticas e ureidas = violeta (1/2h); marron-amarelo	—	—	Côr rosa ou azul rápid. a frio = AIA e comp. relacionado a Indol +
Reag. ácido oxidante	(b) AIA = rosa intensa; outros indóis que dão AIA por hidrólise = rosa lenta/; Triptofano e Triptaminas = amarelo claro amarelada (1/2h) lenta/.	rosa (imediat.); rosa intensa (10 min.); rosa clara amarelada (1/2h)		Indol +
Reag. de van Urk	(c) Indóis = azul-violeta, azul esverdeado	Azul-violeta		Indol +
Reag. de Prochazka	(d) Indóis = côr amarela	Amarelo-pardacento	Fluores. amar.	Indol +
Reag. ácido sulfanílico	(e) Comp. fenólicos, inclus. 4, 5, 6 OH-indóis = verm., verm. púrpura, verm. cast.; alguns ác. Indólic. = alaranjado-claro	Alaranjado claro	cast.	Indol + fenólico?
Reag. a-Nitroso	b-Naftol 5 OH-indóis = violeta com fundo amarelado-claro	Violeta lenta/		5 OH-indol +
Reag. ác. Nítrico	(f) Indol-acetonitrila = azul-cinza ou verde oliva. Fluores. verde intensa. Outros indóis = amarelo-claro ou marron.	marron claro		Negat. para Indolil-acetonitrila-; Indol +
Ácido Nítrico	(h) Difetilamina e deriv. amina aromática + zária = ± azul	rosa azulada		Amina aromática +

TABELA N.º 3 — Continuação

Reagentes	Especif. do Regente	Result. obtid. com Cy	Luz U. V.	Observações
Ácido Sulfúrico	(i) Alcalóides, glicosídeos, aminas formam product. de decomposição que fluorescem à luz U.V.	Amarelo-pardacento	Fluores. a-mar. fraca; amar. intensa (24h)	
Ninhidrina-ác. acético	(j) Triptamina-NH ₂ = rosa-cast. e forte fluore. azul-esverdeada T-NHR = cor visível forte mas peq. fluore. T-NRR = sem cor, sem fluore	Marron-claro roseo	—	T-NH ₂ — T-NHR ? T-NHR ?
Ninhidrina- piridina	(l) a-aminoác. indólico = púrpura ou púrp.-cinz. Série Triptamina-NH ₂ = púrp. lent. a frio e ráp. a quente. 1 subst. = cor fraca; dupla subst. = não há reação	Não houve reação		T-NH ₂ — T-NHR ? (reag. j) T-NHR ?
Reag. 2, 4-dinitrofenil hidrazina	(m) 3-Indolil-aldeído = verm.cast. Outros indóis com Carbonila = marron ou amarel. lenta/.	Amarelo		3-Indolil-aldeído — Indol com Carbonila +
Reag. Nitrato de prata-alcalino	(n) Enóis e fenóis oxidáveis = mancha preta ou marron esc. (amino-fenóis, Serotonina, Bufotenina, Ceto-ác. enólicos.)	Preto lenta/		
2,6-Diclorofenol - indofenol	(o) Ácidos = cor rosa	rosa		Ácido +
Verde de bromo cresol	(p) Ácidos = cor amarela Bases = cor azul	Amarelo		Ácido +

ção para Triptamina-NH₂ foi negativa (j, l), havendo possibilidade para Triptaminas-NHR e NRR'. Além disso, a substância parece possuir carbonila (m) e propriedade ácida (o, p).



R' = possível -OH

R'' = possíveis carbonila e -NHR ou -NRR.

Os resultados conclusivos a respeito da natureza química da substância inibidora deverão ser apresentados após realização de mais alguns ensaios físico-químicos, inclusive estudos sôbre possíveis processos de degradação ocorridos no decorrer das experiências. Confirmações biológicas deverão ser feitas usando-se substâncias padrões, o que está na dependência da obtenção das últimas.

TABELA N.º 4

Composto	Inspir. Am	But. acét.
N-Acetil-Indoxil	82	85
N : N-Dimetil-5-hidroxi-Triptamina (acetato)	90	60
N-Etil-Triptamina (HCl)	98	85
Metil-indolil acetato	92	74
a : a-Dimetil-Triptamina (acetato)	90	82
b : b-Dimetil-Triptamina (oxalato)	92	81
Etil-indolil-acetato	95	95
N-Etil-Triptamina (HCl)	93	83
a-EtilTriptamina (acetato)	92	84
Gramina	95	72
Indol	90	95
3-Indolil-aldeido	92	92
Indolil-acetamida	80	88
Ácido 3-Indolil acético (AIA)	35	90
Indolil-acetonitrila	87	95
Indolil-propano 1:2-diol	82	82
Metil-indolil acetato	95	95
7-Metil-3Indolil acetonitrila	88	98
a-Metil-Triptamina (acetato)	88	78
Escatol	92	98
Triptamina	83	72

Dados extraídos da tabela n.º 9. 2 — Smith, 1960.

5 — Verificação da termoestabilidade do inibidor — Para êsse fim foram preparados 3 grupos de discos de papel de filtro embebidos em 0,2ml de extrato bruto em éter. Os discos, colocados em placas de Petri, foram submetidos a seguintes tratamentos: o 1.º grupo foi mantido em condição ambiente (controle); o 2.º levado a uma estufa durante 2 horas a 100°C; o 3.º, acrescido de 3ml de água destilada, foi levado a estufa nas mesmas condições do grupo anterior. Paralelamente, mais 3 grupos de discos de papel embebidos em éter puro (controle do solvente) receberam tratamento idêntico aos 3 primeiros. Após os tratamentos, todos os grupos receberam 3ml de água destilada e sementes de arroz postas para germinar sôbre os discos. A figura n.º 7 mostra os resultados dessa experiência. As sementes germinadas e crescidas sôbre discos do 1.º grupo apresentaram inibição esperada tanto da raiz primária como dos pêlos absorventes; as do 2.º grupo já apresentaram crescimento superior às do 1.º, mas ainda muito inferior ao

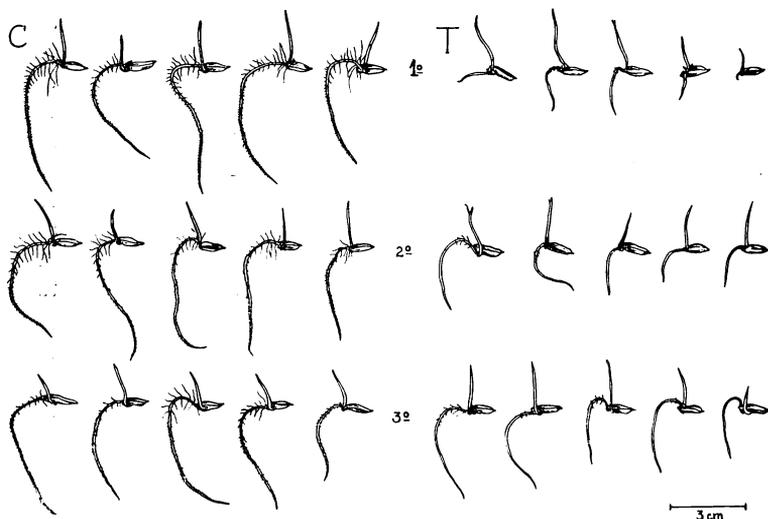


Fig. 7 — Plântulas de *Oryza* germinadas em placas de Petri: T = grupos tratados, 1.º com extrato de Cy em éter; 2.º com extrato de Cy submetido à temperatura de 100.º C durante 2 horas; 3.º com extrato de Cy + água após evaporação do éter e submetido a 100.º C durante 2 horas C = respectivos grupos controles.

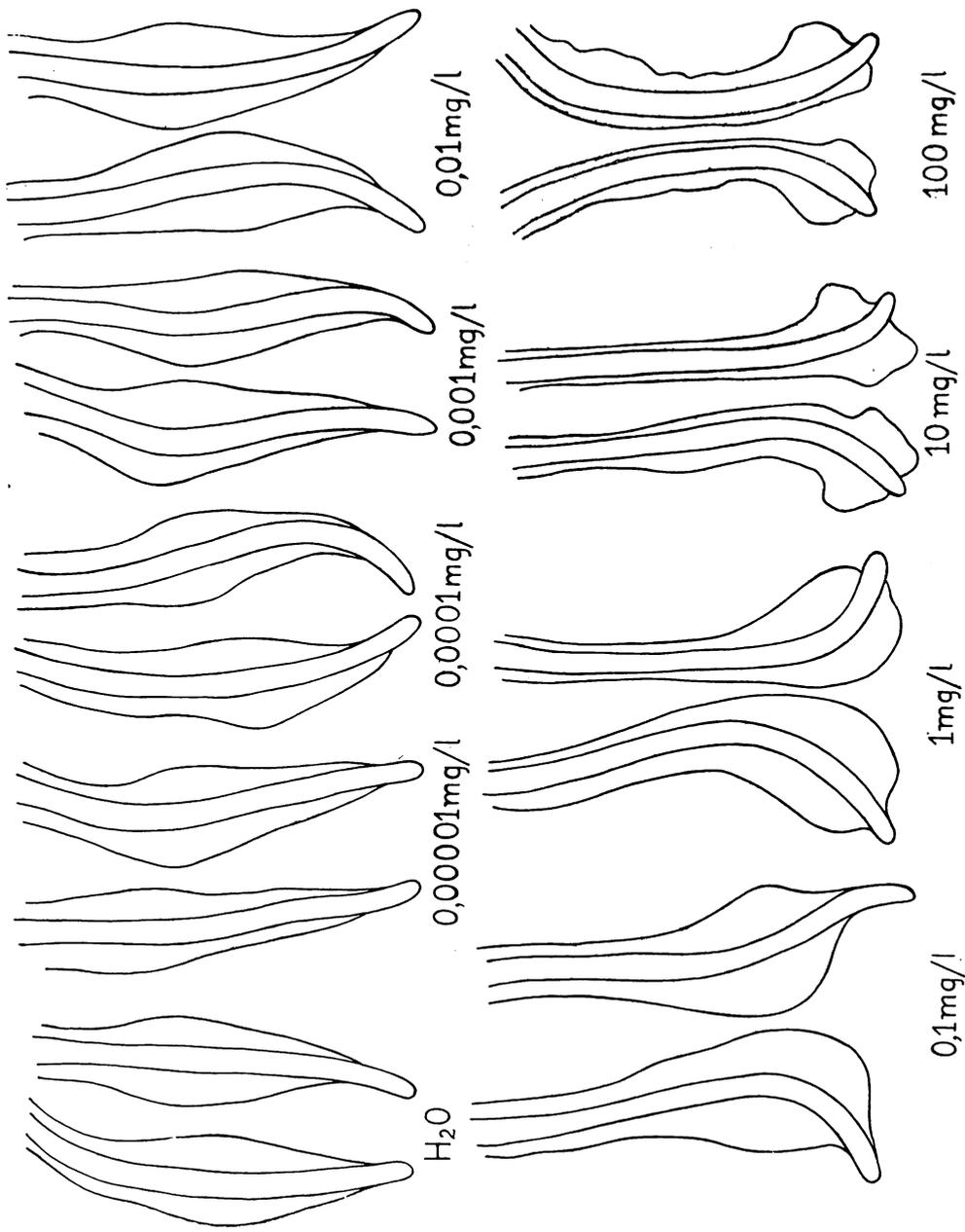


Fig. 8 — Efeito de AIA no desenvolvimento de pêlos absorvidos da raiz primária de *Oryza* (Teste de *Oryza*). Controle em água destilada.

controle; as do 3.^o grupo mostraram crescimento maior, embora inferior ao controle. Os pêlos absorventes tiveram desenvolvimento sempre menor, ou praticamente ausente, nas plantas tratadas. Esses resultados mostram que ocorreu uma parcial degradação do composto inibidor presente no extrato. A degradação foi maior no 3.^o grupo, isto é, nos discos embebidos em extrato e acrescidos de água antes do tratamento a 100°C. Grande parte do inibidor parece, no entanto, permanecer ativo nos extratos tratados, o que indica uma relativa termoestabilidade do mesmo.

- 6 — Estudo da interação do extrato de *Cyperus* e ácido 3-indolil acético (AIA). É sabido que a concentração ótima de AIA requerida para o crescimento das raízes é extremamente baixa. Concentrações supra-ótimas inibem o crescimento. Assim, foi inicialmente verificado o efeito de diversas concentrações de AIA no crescimento da raiz primária e dos pêlos absorventes de *Oryza* e comparado com o do inibidor. A figura n.^o 8 mostra a projeção das raízes primárias de plântulas tratadas com AIA no intervalo das concentrações: 0,00001 — 0,0001 — 0,001 — 0,01 — 0,1 — 1,0 — 10,0 — 100,0 mg/1. Nas concentrações superiores a 0,001 mg/1, o crescimento das raízes foi inibido, embora os pêlos absorventes não o tenham sido na mesma escala. Estes, nas concentrações mais altas (100,0 — 10,0 mg/1), formaram tufos altos nas regiões subapicais das raízes como consequência da inibição ocorrida na elongação das mesmas. Nas concentrações 1,0 — 0,1 e 0,01 mg/1 houve, por outro lado, um estímulo no crescimento dos pêlos em relação ao controle em água. Em plantas tratadas com o inibidor, não ocorreu nenhum caso de estímulo em tôdas as concentrações utilizadas e nas mais elevadas os pêlos eram fortemente inibidos, sendo praticamente ausentes (Fig. n.^o 9). Para a verificação da interação do inibidor/AIA, foram preparadas 6 séries de 6 placas de Petri revestidas com papel de filtro (9 cm de diâmetro) e contendo, respectivamente, 0,1ml de extrato 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e a última, éter puro. Após perfeita evaporação do solvente éter, cada grupo de 6 placas contendo determinada quantidade de extrato recebeu:

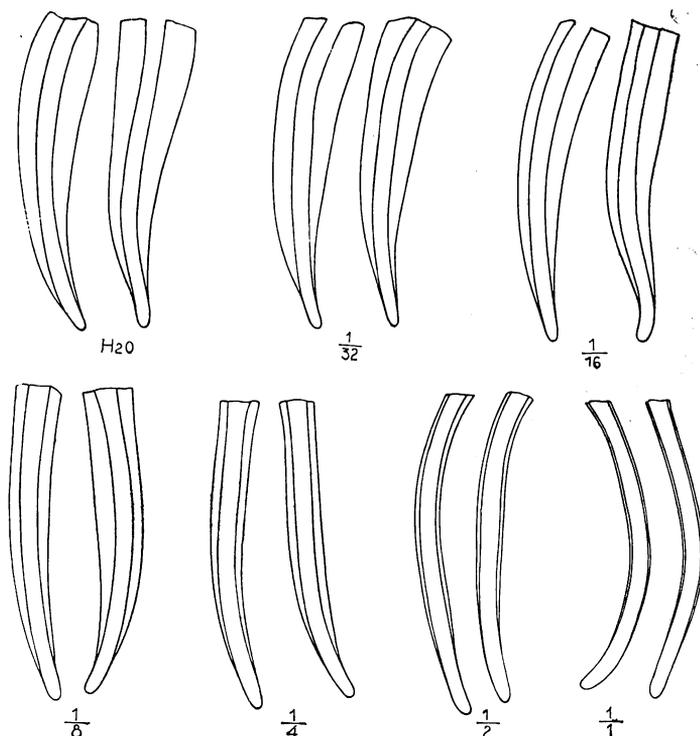


Fig. 9 — Efeito do extrato bruto de *Cy* em éter no desenvolvimento de pêlos absorventes da raiz primária de *Oryza* (Teste de *Oryza*). Contrôlo em água destilada.

água destilada, AIA a 0,01 — 0,1 — 1,0 — 10,0 e 100,0 ml/g, respectivamente, de modo que as 36 placas continham as várias combinações do extrato de *Cyperus* e de AIA, menos uma com água destilada. Plântulas recém germinadas de *Oryza* foram colocadas nessas placas e após 48 horas, efetuadas as medidas das raízes primárias. Os resultados estão expostos nas figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16, expressos em porcentagem de crescimento em relação ao controle (controle em água na fig. 10 e 11 e nas demais, AIA em diversas concentrações). A figura n.º 10 mostra que houve inibição em tôdas as concentrações de AIA utilizadas. As várias diluições do extrato de *Cyperus* causaram, igualmente, inibição no crescimento das

raízes (Figura n.º 11). Nas placas contendo AIA a 0,01 a 0,1 mg/l, a adição do extrato provocou inibição tanto maior, quanto maior a concentração, com excessão de 1/16 que favoreceu ligeiramente o crescimento (Figuras 12 e 13). Esse efeito positivo do extrato a 1/16 foi acentuado na placa contendo AIA a 10,0 ml/l, (Figura n.º 14). Nas placas contendo AIA a 10,0 mg/l, as diluições 1/4, 1/7 e 1/16 do extrato causaram inegável efeito antagônico à auxina, favorecendo o crescimento das raízes em relação ao controle (Figura n.º 15). Na concentração de 100,0 ml/l de AIA, extremamente alta que sempre causa forte inibição no crescimento das raízes, a adição do extrato atenuou novamente o efeito inibidor, se bem que de maneira irregular e em menor escala que na anterior (Figura n.º 16). Em nenhuma das misturas de AIA com o extrato foi observado um crescimento superior ao do controle em água destilada.

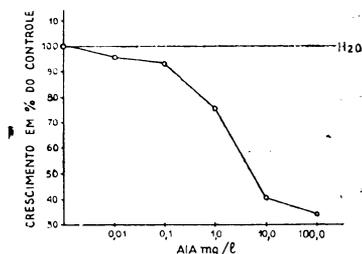


Fig. 10 — Efeito de AIA no crescimento da raiz primária de *Oryza*, expresso em % do controle em água destilada.

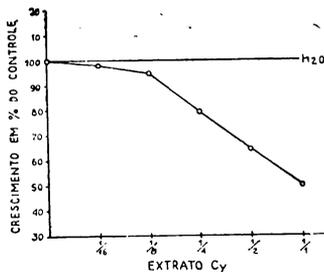


Fig. 11 — Efeito do extrato bruto de Cy no crescimento da raiz primária de *Oryza* expresso em % do controle em água destilada.

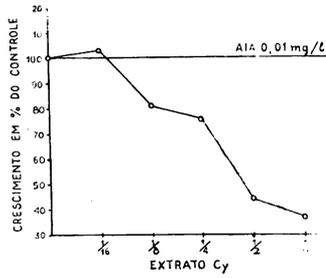


Fig. 12 — Interação do AIA a 0,01 mg/l com diversas concentrações do extrato de *Cyperus* no crescimento da raiz primária de *Oryza*. Crescimento expresso em % do controle em AIA a 0,1 mg/l puro.

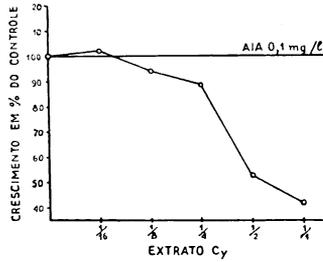


Fig. 13 — Idem a anterior — AIA a 0,1 mg/l.

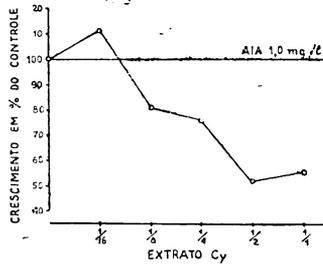


Fig. 14 — Idem a anterior — AIA a 1,0 mg/l.

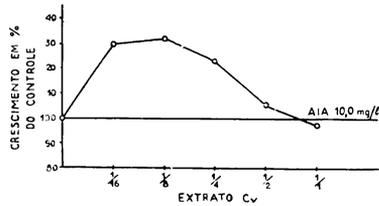


Fig. 15 — Idem a anterior — AIA a 10,0 mg/l.

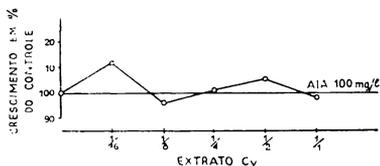


Fig. 16 — Idem a anterior — AIA 100,0 mg/l.

DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

Substâncias inibidoras de germinação e crescimento são de larga distribuição entre os vegetais e, em muitos casos, parece exercer papel de importância no processo do desenvolvimento da própria planta e no de outras (Meguro, I — no prelo). Numerosos inibidores pertencentes ao grupo dos ácidos fenólicos e derivados, lactonas insaturadas, ftalídeos e glicosídeos foram identificados, ao lado de outros de natureza química desconhecida (Hemberg, 1961). A substância inibidora de crescimento presente no rizoma de *Cyperus rotundus* L. parece pertencer ao grupo dos compostos indólicos, o que ainda deverá ser confirmado. Pode ser extraída em água, álcool etílico e em éter, apresentando melhor rendimento no último. O Rf se localiza em torno de 0,9 tanto no sistema de solvente Isopropanol: amônia, como em Butanol: ác. acético. Apresenta, ainda, absorção na luz U.V. na faixa compreendida entre 210-300 mu, com um máximo em torno de 245-247 mu. A termo-estabilidade é moderada e além disso, a substância pode ser adsorvida em carvão animal (Meguro, I — no prelo). Tumbleson e Kommedahl (1962) estudaram o inibidor presente em *Cyperus esculentus* L. encontrando as seguintes propriedades: Rf em torno de 0,9 em Butanol: ác. acético; solúvel em água e metanol mas pouco solúvel em etanol absoluto; não volátil; dializável; termo-estável; não é adsorvido em carvão ativado (Norit A) nem em resinas de troca iônica (catiônica e aniônica) mas pode ser adsorvida em coluna de Alumina. Pela comparação, podemos verificar que há pontos de semelhanças mas que não nos permitem concluir pela similaridade das duas substâncias nas espécies consideradas, porquanto ocorrem certas diferenças, além do problema da metodologia diversa.

Segundo Tumbleson e Kommedahl (1962), o inibidor exerceria papel importante na dormência dos tubérculos de *C. esculentus* que só germinariam após submetidos à lavagem pela água de chuva. Tubérculos colhidos em outono, lavados em água corrente fria mostraram um aumento no brotamento e quando tratados com o extrato, inibição no processo. O extrato de *C. esculentus* inibe, ainda, a germinação e o crescimento de diversas plantas de cultura. O extrato de *C. rotundus* inibe, igualmente, o brotamento dos próprios rizomas assim como o crescimento de diversas plantas e germinação de algumas (Meguro, I — no prelo).

O mecanismo de ação dos inibidores não é bem conhecido e diversos autores discutem a possibilidade de uma interação auxina-inibidor na regulação de diversos estágios do desenvolvimento dos vegetais (Hemberg, 1961; Housley, 1961; Jönsson, 1961). Embora o conceito dos inibidores, segundo Larsen (1955) deva ser “substâncias que retardam o crescimento tanto das células do caule como da raiz, não apresentando efeito estimulador em qualquer gama de concentração”, muitos desses compostos podem mostrar efeito sinérgico, isto é, estimular o efeito de AIA, quando aplicados no determinado limite de concentração nos ensaios biológicos. Podemos citar entre eles, ácido 2, 3, 5-tri-iodo benzóico, Cumarina, Protoanemonina, ácido Chelidônico, etc. (vide Leopold, 1955). O inibidor presente em *C. rotundus* apresentou efeito semelhante no crescimento da raiz primária de *Oryza*, quando aplicado em concentração baixa em presença de altas doses (supra-ótimas) de AIA. A inibição do crescimento da raiz causada por concentrações supra-ótimas de AIA foi parcialmente antagonizada pelo extrato de *C. rotundus*.

RESUMO

O presente trabalho procura investigar a natureza e as propriedades da substância inibidora de crescimento presente no extrato de rizoma de *Cyperus rotundus* L.

A substância pode ser extraída em água, álcool etílico e éter.

Estudos cromatográficos mostraram que o Rf está em torno de 0,9 nos solventes: Isopropanol: amônia e Butanol: ác. acético. A

localização da faixa ativa foi feita por meio de teste biológico especialmente elaborado para êsse fim (Teste de *Orysa* e com o auxílio de uma lâmpada de luz U.V.

Estudos espectrofotométricos mostraram absorção na luz U.V. na faixa compreendida entre 210-300 μ , com um máximo em torno de 245-247 μ .

Ensaio químicos com diversos reagentes indicaram a possível natureza indólica da substância.

A substância apresenta termo-estabilidade moderada.

Finalmente, foi verificada a interação do extrato de *Cyperus* e AIA em diversas concentrações no crescimento da raiz primária de *Orysa sativa* var. agulha dourada.

SUMMARY

The inhibitory substance present in the rhizome of *Cyperus rotundus* L. is extractable in water, ethanol and ether, being the last the most efficient solvent.

Chromatographic studies using Isopropanol-Amônia-Water system on paper (Whatman number 1) revealed a R_f around 0,9.

Absorption spectra in the U.V. showed a maximum absorption at 245-247 μ band.

A specially elaborated biological test was employed to determine its activity: the *Orysa test*, based on the development of the root hairs and root elongation of *Orysa sativa* "var. agulha dourada" seedlings.

All the physico-chemical assays done suggested the indollike nature of the compound.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo que forneceu auxílios para a aquisição de uma câmara-estufa e serviços técnicos.

À Rockefeller Foundation por diversos aparelhos utilizados.

Ao Instituto Agrônômico do Sul (Pelotas, R. G. Sul) pelas sementes de aveia utilizadas nos ensaios biológicos.

Ao Instituto Agrônômico de Campinas pelas sementes de *Orysa sativa* var. agulha dourada.

À Sra. Gilda de Fazio do Instituto Biológico de São Paulo que nos cedeu várias substâncias padrões.

Ao Dr. Francisco J. S. Lara do Depto. de Botânica pela orientação na parte da técnica metodológica.

À Srta. Maria Vittoria Bonomi pelos serviços prestados.

À D. Maria José Guimarães do Depto. que cobriu os gráficos a nankin.

Ao Sr. Antônio Previatto pela coleta do material necessário.

BIBLIOGRAFIA

- Hemberg, T. — 1961 Biogenous inhibitors. In W. Ruhland, *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. XIV: 1162-1184.
- Housley, S. — 1961 — Kinetics of auxin-induced growth. In W. Ruhland, *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. XIV: 1007-1043.
- Jönsson, A. — 1961 — Chemical structure and growth activity of auxins and antiauxins. In W. Ruhland, *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. XIV: 959-1006.
- Larsen, P. 1955 — Nomenclature of plant growth substances. *Plant Physiology*, 30: 190-191.
- Leopold, A. C. — 1955 — *Auxins and Plant growth* — University of California Press. Berkeley and Los Angeles.
- Meguro, M. — (no prelo) — Substâncias reguladoras de crescimento em rizoma de *Cyperus rotundus* L. — I — Efeito do extrato de rizoma na germinação e crescimento de plantas superiores.
- Pilet, P. E. — 1961 — *Les Phytohormones de croissance*. Masson et Cie Éditeurs. Paris.
- Smith, I. — 1960 — *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*. Vol. 1 — Chromatography. Interscience Publishers, Inc. N. Yory. delberg. N. York.
- Stahl, E. — 1965 — *Thin-layer Chromatography*. Springer Verlag. Berlin. Hei
- Tumbleson, M. E. and T. Kommedahl — 1962 — Factors affecting dormancy in tubers of *Cyperus esculentus*. *Bot. Gaz.* Vol. 123, n.º 3: 186-190.
- Wain, R. L. and F. Wightman — 1956 — *The chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances*. Butterworths scientific Publications. London.