

AÇÃO INIBIDORA DO EXTRATO DE RIZOMA DE *CYPERUS*
ROTUNDUS L. NO DESENVOLVIMENTO DE
ALGUNS FUNGOS

Marico Meguro
Maria Vittoria Bonomi

ACÇÃO INIBIDORA DO EXTRATO DE RIZOMA DE *CYPERUS
ROTUNDUS L.* NO DESENVOLVIMENTO DE
ALGUNS FUNGOS.

MARICO MEGURO

MARIA VITTORIA BONOMI *

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

O plano do presente trabalho foi baseado na observação feita durante o estudo da acção do extrato de rizoma de *Cyperus rotundus L.* ("tiririca") na germinação e crescimento de algumas plantas superiores. Verificou-se, inicialmente, que sementes germinadas em placas de Petri contendo extrato de rizoma apresentavam baixo índice de contaminação por fungos (Meguro, I — no prelo). Cromatografado o extrato, foi identificada uma faixa com forte absorção na Ultra violeta e que provocava apreciável inibição no crescimento de raízes e pêlos absorventes de plantas superiores (Meguro, II — no prelo), assim como de fungos. Procuramos, então, estudar com maiores detalhes, o comportamento de alguns fungos em face aos tratamentos com diferentes concentrações de extrato bruto e cromatografado.

MATERIAIS E MÉTODOS

- 1 — Os métodos de extração e purificação foram os mesmos empregados no trabalho anterior (Meguro, II — no prelo) e podem ser resumidos nos seguintes itens:
 - a — Extração a frio ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) em éter recém-distilado de rizoma previamente congelado e macerado. Proporção: 100g de rizoma /200 ml de éter.

* Bolsista-estudante da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo no período agosto de 1964 — dezembro de 1965, durante o qual estagiou no Departamento de Botânica.

- b — Concentração do extrato bruto obtido à baixa pressão e à temperatura nunca superior a 37°C. Volume final obtido: 1/20 do inicial.
 - c — Purificação por cromatografia ascendente em papel Whatmann nº 1, previamente lavado em solvente utilizado — Isopropanol: Amônia: água:: 8: 1: 1.
- 2 — Identificação da faixa ativa no cromatograma: —
- a — Por meio de lâmpada de luz ultra violeta (Mineral light — AVS — 11, 115V, 60 cycles — 0,12 A).
 - b — Confirmação por método biológico, inoculando-se fungo sobre cromatograma dividido em 10 seções, cobertas com meio de cultura (Sabouraud-prova) e mantidas em meio estéril.
- 3 — O método de aplicação do extrato bruto e cromatografado em diversos fungos será descrito no decorrer do trabalho.
- 4 — A avaliação do efeito de aplicação do extrato foi feita de 2 maneiras:
- a — medida do diâmetro da colônia desenvolvida sobre meio de cultura com auxílio de uma lupa provida de ocular milimetrada.
Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do crescimento do fungo tratado em relação ao não tratado.
 - b — determinação do pêso sêco do micélio cultivado em meio líquido contendo ou não extrato do rizoma. Os resultados foram igualmente expressos em porcentagem de inibição do tratado em relação ao não tratado.
- 5 — Fungos submetidos ao tratamento:
- a — *Aspergillus niger van Tiegh*: — um dos fungos mais frequentes no laboratório como contaminante de sementes em germinação, culturas de tecidos vegetais, etc. Além disso, parece ser um dos fungos mais frequentes nos diversos tipos de solos (Agnihotri, 1963).
 - b — *Cylindrosporium sp* — isolado do tomateiro var. St^a Cruz cultivado em solução nutritiva deficiente em potássio e que apresentou sintomas de doença de murchar..
 - c — *Botrytis cinerea* Pers.

- d — *Colletotrichum chardonianum* Nolla.
- e — *Cylindrocladium scoparium* Morgan.
- f — *Diplodia natalensis* P. Evans.
- g — *Fusarium orthoceras* App. et Wr.
- h — *Fusicoccum amygdali* Del.
- i — *Pestalotia* sp.
- j — *Phytophthora capsici* Leon.
- l — *Rhizoctonia solani* Kühn.
- m — *Rosellinia* sp.
- n — *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary.
- o — *Sclerotium rolfsii* Sacc.

As características bio-patológicas dos fungos utilizados podem ser encontradas em diversas publicações, entre as quais: Alexopoulos — 1962, Gäumam — 1950, Heald — 1926, Lilly — 1951, Stakman and Harrar — 1957, Walker — 1950.

Todos os fungos, menos os dois primeiros, foram fornecidos gentilmente pelo Instituto Biológico de São Paulo.

- 6 — Meios de cultura para fungos:
 - a — Sabouraud-prova foi o mais freqüentemente utilizado.
 - b — Agar-batata, meio favorável à maioria dos fungos citados, mesmo aos de crescimento reduzido em Sabouraud-prova.
 - c — Agar-batata acrescido de vitaminas como tiamina e riboflavina para fungos *Colletotrichum chardonianum*, *Diplodia natalensis*, *Sclerotinia sclerotiorum*.
 - d — Meio líquido utilizado em algumas experiências: maltose 2%.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

- 1 — Verificação do efeito do extrato bruto:
 - a — Para cada fungo testado foram tomados 12 tubos de ensaio, 6 dos quais contendo 10 ml de meio de cultura Sabouraud-prova e 6 restantes com igual quantidade de agar-batata, previamente esterizados em autoclave.
 - b — Cada conjunto de 6 tubos foi dividido em 3 grupos de 2: o primeiro grupo foi tomado como testemhunha; o

- segundo grupo recebeu 0,1 ml de éter puro (testemunha para o solvente); o terceiro recebeu 0,1 ml de extrato de rizoma bruto.
- c — Após perfeita evaporação do solvente éter, o fungo foi inoculado e cada conjunto mantido em condições normais de laboratório.
 - d — As observações foram feitas após 3,5 e 7 dias e basearam-se no desenvolvimento relativo do micélio na superfície do meio de cultura, atraso ou não no processo de esporulação, densidade da mesma, etc. Todas essas observações estão concatenadas na tabela nº1. O tratamento com o extrato inibe, de modo geral, o desenvolvimento de todos os fungos e atrasa sensivelmente o processo de esporulação em alguns. Por outro lado, a intensidade do efeito inibidor varia de fungo para o fungo assim como do meio de cultura utilizado.
- 2 — Verificação do efeito do extrato cromatografado: identificação da faixa ativa usando o fungo *Aspergillus niger*.
- a — 10 placas de Petri contendo cada uma 2 lâminas de vidro foram esterilizadas.
 - b — 2 cromatogramas foram preparados: o 1º com aplicação do extrato de cm em cm, em pontos de 10 ul cada; o 2º com aplicação de igual quantidade de éter (controle). Cada cromatograma foi dividido em 10 seções paralelas à base.
 - c — Cada seção do cromatograma com extrato foi colocada sobre uma das lâminas contidas na placa. A 2ª lâmina de cada uma das placas recebeu a faixa correspondente do cromatograma controle. Em seguida, todas as seções foram cobertas com 0,6 ml de meio Sabouraud-prova fundido.
 - d — Solidificado o meio, o fungo foi inoculado no centro da preparação. As placas foram mantidas em estufa a $23^{\circ}\text{C} \pm 0,5$.
 - e — As medidas de diâmetro das colônias foram efetuadas após 72 h. A tabela nº 2 mostra que a maior inibição ocorreu na faixa 9 seguida de 8, diminuindo na 7. O

exame do cromatograma à luz ultra — violeta confirmou a maior concentração da substância ativa nas faixas 9 e 8 e uma ligeira cauda na 7.

TABELA Nº 1

Fungo	meio de cultura		Desenvolvimento relat.			Observações no tratado — 3, 5, 7 dias
	Contr.	C+eter	Ext.	Cy		
<i>Aspergillus niger</i>	(s) +++++	(a) +++++	++++	+++	++	Esporulação retardada mas mais densa.
<i>Botrytis cinerea</i>	(s) ++	(a) +++	++	++	—	Esporulação retardada.
<i>Colletotrichum chardonianum</i>	(s) +++	(a) +++++	+++	++++	++	Esporulação retardada.
<i>Cylindrocladium scoparium</i>	(s) ++	(a) +++	++	+++	+	
<i>Cylindrosporium</i> sp.	(s) +++++	(a) ++	++++	+++	++	Hifas curtas e compactas.
<i>Diplodia natalensis</i>	(s) ++	(a) +++++	++	++++	+	
<i>Fusarium orthoceras</i>	(s) +++++	(a) +++++	+++	++++	+±	Hifas ralas.
<i>Fusicoccum amygdali</i>	(s) +	(a) +±	+	+	—	maior tempo de incubação necessário.
<i>Pestalotia</i> sp.	(s) +++	(a) +++++	+++	++++	++	Hifas menos densas e esporulação retard.
<i>Phytophthora capsici</i>	(s) ++	(a) +++	+±	+++	+	micélio baixo e gelatinoso. Alto no contr.
<i>Rhizoctonia solani</i>	(s) +++++	(a) +++++	++++	++++	+	
<i>Rosellinia</i> sp.	(s) ++	(a) +	++	+	±	Micélio rarefeito e colônia + achatada.
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	(s) ++	(a) ++	++	++	—	maior tempo de incubação necessário.
<i>Sclerotium rolfsii</i>	(s) +++	(a) +++++	+++	++++	+±	Hifas + curtas e formação do esclerotio retardada.

Convenções: +++++ desenvolv. muito grande. + desenvolv. reduzido.
 +++ desenvolv. grande. ± desenvolv. insignificante.
 ++ desenvolv. moderado. — desenvolv. nulo.
 (s) = Sabouraud-prova. (a) = Agar-batata.

TABELA Nº 2

Nº das faixas	diâmetro da colônia em mm		% de inibição
	Controle	Extrato 20 ul	
1	8,0	8,0	—
2	8,0	8,0	—
3	8,0	8,0	—
4	9,0	8,0	11,1
5	8,0	8,0	—
6	6,5	6,5	—
7	8,0	6,5	18,7
8	8,0	6,0	25,0
9	6,5	4,5	30,7
10	7,0	7,0	—

3 — Efeito do extrato cromatografado no desenvolvimento de diversos fungos.

a — Após a identificação da faixa ativa pela exposição do cromatograma à luz U.V., a mesma era dividida em seções de cêrca de 2 x 5 cm, contendo 10, 20 e 30 ul de extrato. Tais seções foram preparadas da mesma maneira que na experiência do item anterior, tendo sido colocadas em placas de Petri esterilizadas ao lado de respectivas seções do cromatograma controle e cobertas com 0,6 ml de meio de cultura fundido.

b — Inoculado o fungo, o conjunto era mantido numa estufa à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ e observações efetuadas após 42 horas em períodos determinados. Em alguns fungos de desenvolvimento mais lento, os períodos de observação foram prolongados.

A tabela nº 3 representa os resultados de uma das experiências feitas com *Aspergillus niger*, com 10 repetições (para cada concentração). O mesmo critério foi adotado para todos os fungos estudados, obtendo-se, dessa maneira, cêrca de 120 tabelas semelhantes das quais serão apresentados apenas os resultados em têrmos de porcentagem de inibição, dos mais representativos (Tabelas nº 4, 5 e 6).

TABELA Nº 3

Nº de placas	diâmetro da colônia em mm		% de inibição
	Controle	Tratado 20 ul	
1	14,0	9,0	35,7
2	12,0	9,0	25,0
3	12,0	9,0	25,0
4	14,0	9,0	35,7
5	15,0	9,0	40,0
6	14,0	9,0	35,7
7	15,0	9,0	40,0
8	15,0	9,0	40,0
9	15,0	9,0	40,0
10	14,0	9,0	35,7
Médias	14,0 ± 0,3	9,0 ± 0,0	35,3 ± 1,8

TABELA Nº 4

Fungo (42-48 h)	% de inibição		
	10 ul	20 ul	30 ul
<i>Aspergillus niger</i> (s)	25,3±1,8	35,3±1,8	44,2±1,2
<i>Botrytis cinerea</i> (s)	35,3±1,9	32,6±4,6	59,4±2,4
<i>Colletotrichum chardonianum</i> (a*)	+	+	+
<i>Cylindrocladium scoparium</i> (a)	42,7±1,7	75,6±0,2	87,7±6,1
<i>Cylindrosporium</i> sp. (s)	36,0±2,6	45,6±1,3	42,8±1,9
<i>Diplodia natalensis</i> (a*)	41,3±4,8	54,2±4,1	63,6±3,0
<i>Fusarium orthoceras</i> (s)	—	46,4±5,3	56,5±5,6
<i>Fusicoccum amygdali</i> (a*)	+	+	+
<i>Pestalotia</i> sp. (s)	40,9±4,1	—	64,7±2,5
<i>Phytophthora capsici</i> (s)	69,0±2,3	100,0±0,0	100,0±0,0
<i>Rhizoctonia solani</i> (s)	38,9±5,1	50,6±3,2	64,6±1,7
<i>Rosellinia</i> sp. (s)	55,8	80,9	82,9
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (a)	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
<i>Sclerotium rolfsii</i> (a*)	49,7±10,1	49,0±5,2	98,3±1,7

(s) = sabouraud-prova como meio de cultura.

(a) = agar-batata.

(a*) = agar-batata + tiamina e riboflavina.

O desenvolvimento lento dos micélios dos fungos *Colletotrichum* e *Fusicoccum* não permitiu a realização da medida nos mesmos no pe-

ríodo de 42-48 horas. *Rosellinia* por sua vez, apresentou um crescimento muito irregular e desvios da média muito altos o que compromete a apreciação quantitativa das medidas.

Na tabela nº 5 estão expostos os resultados das medidas efetuadas no período 66-72 horas.

O período de observação dos fungos *Colletotrichum*, *Rosellinia* e *Sclerotium* foi prolongado até 93-96 horas (Tabela nº 6). *Fusicoccum* foi abandonado para fins de medidas quantitativas uma vez que apresentava crescimento extremamente irregular. Qualitativamente, no entanto, foi possível verificar o efeito inibidor do extrato no crescimento desse fungo.

TABELA Nº 5

Fungo (66-72 h)	% de inibição		
	10 ul	20 ul	30 ul
<i>Aspergillus niger</i>	—	—	—
<i>Botrytis cinerea</i>	45,4±2,9	50,2±2,2	64,7±2,8
<i>Colletotrichum chardonianum</i>	65,3±9,7	100,0±0,0	100,0±0,0
<i>Cylindrocladium scoparium</i>	25,8±1,7	74,1±1,3	88,4±5,6
<i>Cylindrosporium</i> sp.	42,8±2,2	50,7±1,5	53,5±1,2
<i>Diplodia natalensis</i>	22,2±2,0	36,8±3,8	51,6±3,7
<i>Fusarium orthoceras</i>	—	43,3±3,6	50,0±2,3
<i>Fusicoccum amygdali</i>	+	+	+
<i>Pestalotia</i> sp.	—	—	68,8±1,9
<i>Phytophthora capsici</i>	62,0±2,4	93,8±2,6	100,0±0,0
<i>Rhizoctonia solani</i>	32,9±2,7	50,4±1,6	63,8±1,6
<i>Rosellinia</i> sp.	+	+	+
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	99,8±0,2	100,0±0,0	100,0±0,0
<i>Sclerotium rolfsii</i>	—	—	—

TABELA Nº 6

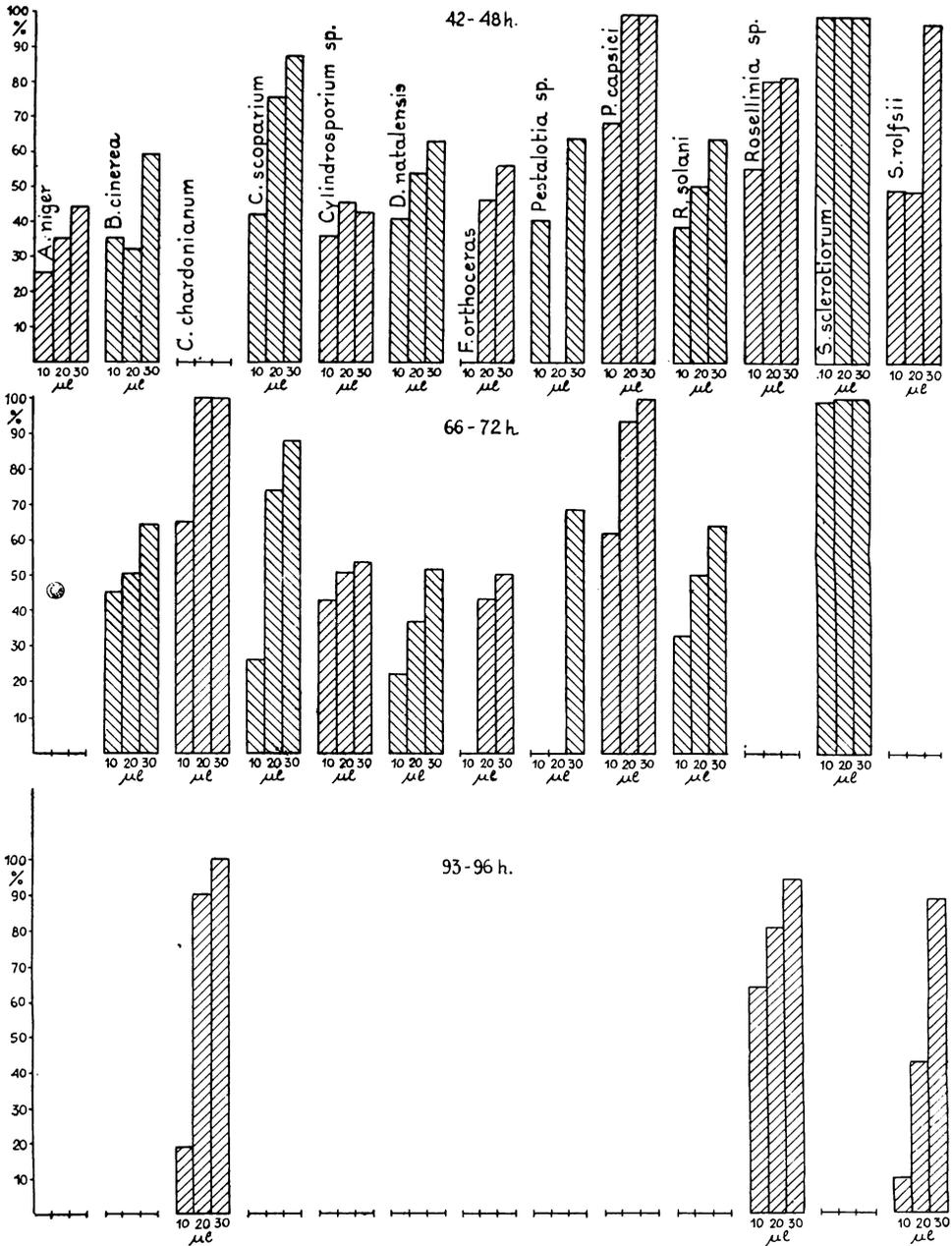
Fungo (93-96 h)	% de inibição		
	10 ul	20 ul	30 ul
<i>Colletotrichum chardonianum</i>	19,1±2,7	90,3±6,9	100,0±0,0
<i>Rosellinia</i> sp.	64,7±9,4	81,1±9,8	94,8±5,1
<i>Sclerotium rolfsii</i>	10,5±2,4	43,4±7,1	89,7±6,7

Afim de se obter uma visão global do comportamento dos diversos fungos em função dos tratamentos assim como do efeito do extrato no decorrer do tempo, os dados das tabelas 4, 5 e 6 foram transportados para a figura nº 1.

Pode-se verificar, em primeiro lugar, que o grau de inibição varia com a espécie do fungo tratado. Entre as mais sensíveis estão: *Sclerotinia sclerotiorum* apresentando 100,0% de inibição a partir de 10 ul do extrato cromatografado. *Phytophthora capsici* e *Colletotrichum chardonianum* com praticamente 100,0% de inibição a partir de 20 ul; *Cylindrocladium scoparium*, *Rosellinia* sp. e *Sclerotium rolfsii*. Entre as menos sensíveis podem ser citadas *Aspergillus niger* e *Cylindrosporium* sp. A inibição, mesmo nas duas últimas, atingiu valores superiores a 40% nas concentrações mais altas de extrato.

O efeito inibidor varia com a concentração do extrato utilizado. De modo geral, a porcentagem de inibição foi tanto maior quanto maior a concentração. Em alguns fungos como *Aspergillus niger*, *Diplodia natalensis* e *Rhizoctonia solani* verificou-se uma proporcionalidade perfeitamente linear.

O efeito inibidor pode variar ou não segundo o tempo de tratamento. Em determinados fungos como *Botrytis cinerea*, *Cylindrosporium* sp. e *Rosellinia* sp., a porcentagem de inibição aumentou com o decorrer do tempo (de 42-48h a 66-72h ou até 93-96h). Em *Colletotrichum chardonianum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, a porcentagem de inibição manteve-se quase que constante, ao passo que em outros, como *Diplodia natalensis*, *Fusarium orthoceras* e *Sclerotium rolfsii* houve redução do efeito. À concentração de 10 ul, o efeito do extrato tende a decrescer com o tempo. O fato de que a porcentagem de inibição aumenta ou se mantém mais ou menos constante mostra que a substância inibidora não degrada no decorrer do tempo. Por outro lado, a diminuição em alguns casos e principalmente nas baixas concentrações do inibidor, pode ser explicada pela capacidade de adaptação do fungo ao tratamento, contrabalançando de alguma maneira o efeito, talvez causando uma degradação biológica da substância.



- 4 — Determinação do pêso sêco do micélio cultivado em meio líquido contendo ou não extrato de *Cyperus*. Três tipos de extratos foram utilizados: extrato bruto, extrato contido na faixa ativa do cromatograma e extrato cromatografado e eluido.
- a — 20 erlenmeyers de capacidade igual a 25 ml foram esterilizados. Em 10 colocamos cêrca de 0,1 ml de extrato bruto e nos 10 restantes, 10 ml de éter puro. Após evaporado o solvente, foram colocados 20 ml de solução 2% de maltose. Nêsse meio foram inoculadas pequenas colônias de *A. niger* prêviamente desenvolvidas (24 h) em placas de Petri contendo o mesmo meio. Todos os frascos foram mantidos em condiçõe sambientes. Após 3 semanas, os micélios foram filtrados em discos de papel de filtro prêviamente sêcos e de pêsos determinados. O conjunto foi colocado numa estufa a 70-80 °C durante 24 horas e pêso sêco determinado. (pêso sêco do conjunto — o pêso inicial do papel). Os resultados estão expostos na tabela nº 7.
- b — Seções de cromatograma contendo cêrca de 50 ul de extrato cada foram colocadas em 7 erlenmeyers de 125 ml esterilizados. Em outros 7 foram colocadas seções correspondentes de cromatograma corrido em branco (controle). 100 ml de maltose 2% foram distribuídos em cada um dos frascos e pequenas colônias de *A. niger* inoculadas. Após 3 semanas, os pêsos sêcos foram determinados (Tabela nº 8).
- c — Cêrca de 50 ul de extrato eluido da faixa ativa do cromatograma foram distribuídos em 10 erlenmeyers de 25 ml esterilizados. Evaporado o solvente éter, foram adicionados 20 ml de maltose 2%. Nos erlenmeyers controles foram colocados igual quantidade de éter utilizado na lavagem da faixa correspondente à ativa do cromatograma corrido em branco. Inoculado *A. niger* nêsses frascos, foram determinados os pêsos sêcos dos micélios após 8 dias (Tabela 9).

A análise dos resultados apresentados nas tabelas mostram haver, também, uma redução no peso seco dos micélios de fungo tratado com o extrato. Embora sendo um método interessante de avaliação do efeito do extrato, não persistimos nêsse tipo de experiência em virtude da grande variabilidade do desenvolvimento apresentado pelos fungos no meio líquido. A avaliação do efeito inibidor pelo método da medida dos diâmetros das colônias apresentou-se mais rápida, simples e com resultados mais homogêneos.

TABELA Nº 7

Nº de frascos	peso seco do micélio em mg		% de inibição
	Controle	Tratado	
1	9,0	4,5	50,0
2	9,5	5,5	42,1
3	11,0	6,5	40,9
4	11,5	9,5	17,4
5	11,5	10,0	13,0
6	12,5	10,5	16,0
7	14,0	10,5	25,0
8	15,5	11,0	29,0
9	16,5	12,0	27,3
10	17,0	12,5	26,5
Médias	12,8 ± 0,9	9,2 ± 1,1	28,7 ± 3,8

Tratamento: 0,1 ml de extrato bruto em 20 ml maltose 2%.

TABELA Nº 8

Nº de frascos	peso seco do micélio em mg		% de inibição
	Controle	Tratado	
1	66,5	47,5	27,1
2	70,5	50,5	28,4
3	87,5	58,0	33,7
4	91,0	68,0	25,3
5	93,0	79,5	14,5
6	97,0	80,0	17,5
7	104,5	90,0	13,9
Médias	87,1 ± 5,2	67,6 ± 6,1	22,9 ± 2,9

Tratamento: 50 ul de extrato cromatografado e não eluido em 100 ml de maltose 2%.

TABELA Nº 9

Nº de frascos	pêso sêco do micélio em mg		% de inibição
	Controle	Tratado	
1	20,5	16,5	19,5
2	21,0	17,0	19,0
3	21,5	17,0	20,9
4	22,5	17,5	22,2
5	23,0	19,0	17,4
6	23,0	19,0	17,4
7	24,0	21,5	10,4
8	27,0	25,0	7,4
9	34,5	28,0	18,8
10	—	—	—
Médias	24,1 ± 1,4	20,1 ± 1,3	17,0 ± 1,6

Tratamento: 50 ul de extrato eluido da faixa ativa do cromatograma em 20 ml de maltose 2%.

DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

A substância inibidora de crescimento presente no extrato de rizoma de *Cyperus rotundus* pode interferir em maior ou menor escala no desenvolvimento de diversos fungos patogênicos. Segundo os resultados experimentais, os principais efeitos de aplicação do inibidor são: retardamento nos processos de germinação e crescimento inicial das hifas; retardamento da esporulação, uma provável conseqüência do efeito anterior; menor desenvolvimento total do micélio verificado tanto pela medida dos diâmetros das colônias como pela determinação do pêso sêco em relação ao controle; inibição total de desenvolvimento nas espécies mais sensíveis.

Embora o mecanismo de ação do inibidor não tenha sido investigado no presente trabalho, devemos discutir alguns dos aspectos relativos à importância de compostos dessa natureza nos vegetais, contra infecções de fungos, bactérias e virus, assim como no desenvolvimento da microflora do solo. Na Patologia, a presença de compostos, principalmente fenólicos, seus derivados e taninos, é freqüentemente associada à resistência e à imunidade nas plantas, embora seja um fato difícil de ser demonstrado (Smith, I — 1960). Podem ser citadas, como exemplos, as variedades resistentes de batatinha contra

Phytophthora infestans, cujas folhas possuem substâncias com atividade fungicida e variedades de maçãs resistentes à *Sclerotinia fructigena*. Os compostos fenólicos identificados com maior frequência são o ácido clorogênico e seus isômeros, entre os quais o ácido isoclorogênico. Byrde e colaboradores (1960) verificaram que ácido clorogênico, d-catequina e l-catequina eram mais ativos quando auto-oxidados. Schaal e Johnson (cit. in Rice, 1965) relacionaram a atividade inibidora dos compostos fenólicos oxidados à quantidade de quinonas resultantes dessa oxidação.

Por outro lado, plantas não vasculares como líquens podem constituir fontes de materiais antibióticos, inibidores de fungos e de plantas superiores. Miller e colaboradores (1965) isolaram do líquem *Umbilicaria papulosa*, dois inibidores: um na fração aquosa do extrato ativo no crescimento de raízes de plântulas de *Cucumis* (Cucumber test) e outro na fração em éter ativo no crescimento de vários fungos. Entre os fungos submetidos ao tratamento por Miller estão: *Botrytis cinerea*, *Diplodia natalensis* e *Scerotinia sclerotiorum*, respectivamente com 100,0%, 52% e 100,0% de inibição no crescimento do diâmetro das colônias em relação ao controle, a 20°C, no período de uma semana. Essas espécies foram as mesmas que se mostraram bastante sensíveis ao extrato de *Cyperus*. Miller e colaboradores compararam, ainda, o efeito fungicida dos extratos de líquem com o de sulfato de cobre, confirmando a grande potência da fração contida em éter. Nessa fração foram identificados cristais de etil-orcelato e orcinol, comumente encontrados como produtos de degradação de dépsides (ésteres de oxiácidos aromáticos entre si, em que a carboxila de uma molécula esterifica com a oxidrila fenólica da outra), componentes básicos dos líquens (Fieser y Fieser, 1948; Shibata, 1958).

A substância inibidora presente no extrato de *Cyperus* parece ser um derivado de indol e não ácido clorogênico ou seus congêneres, como mostraram os resultados de análises espectrofotométricas, Rf nos cromatogramas e reações químicas. Apresenta ainda, certa interação com ácido 3-indolil acético no crescimento de raízes de *Orysa*, antagonizando o efeito da auxina nas concentrações muito altas (Meguro, II — no prelo). Este fato lembra o efeito de certos

inibidores como Hidrazida maleica, 2, 3, 5-tri-iodo benzóico, indol, cumarina, derivados ftalâmicos e ácidos dicarboxílicos, etc., que apresentam atividade sinérgica no limite de determinadas concentrações.

Embora estejam em uso numerosos fungicidas potentes, muitos dos quais sais de metais pesados altamente tóxicos, as investigações em torno de compostos naturais como possíveis fungicidas, sistêmicos ou não, oferecem interesse teórico e prático. O grau de atividade, facilidade na absorção, translocação, a relativa estabilidade, o grau de fitotoxidez e toxidez contra animais são alguns dos pontos importantes na pesquisa de inibidores, assim como a elucidação do mecanismo de ação dos mesmos. No caso particular de *Cyperus*, a presença de um composto com atividade fungicida e, conseqüentemente, uma possível resistência contra infecções, não oferece, à primeira vista, interesse prático por se tratar de uma planta daninha. Pode, no entanto, constituir fonte ou ponto de partida para a elaboração de compostos similares para fins fungicidas. O inibidor presente no extrato de *Cyperus* apresenta considerável fitotoxidez, principalmente sobre plantas jovens (Meguro, I e II — no prelo), o que não impede o seu uso como protetor externo, por exemplo, de produtos armazenados. Considerações de ordem prática devem ser limitadas no presente trabalho, uma vez que os resultados obtidos não permitem entrar no mérito da questão, mas apenas indicam certas possibilidades.

Por outro lado, deve ser lembrada a influência da substância inibidora da planta na composição da microflora do solo: patógenos causadores de doenças dos sistemas radiculares, microorganismos de importância nos diversos processos biológicos que têm lugar na rizosfera, etc. Estudos dessa natureza já foram efetuados por Rice (1965) em torno de 20 espécies de plantas de certa importância na sucessão de campos abandonados de Oklahoma. Demonstrou Rice que cerca de 16 espécies apresentavam substâncias capazes de retardar a atividade das bactérias nitrificantes e fixadoras de nitrogênio. Três espécies pioneiras das mais ativas foram analisadas, isolando-se ácido clorogênico, seus isômeros e gallotânicos. O mecanismo de ação dessas substâncias não foi esclarecido, mas o autor

chama a atenção para a importância ecológica do fato, em vista da larga distribuição de compostos com atividade inibidora, fenólicos ou não, entre os vegetais. (Evenari, 1961; Hemberg, 1961; Smith, I — 1960).

RESUMO:

O presente trabalho estuda o efeito inibidor do extrato de rizoma de *Cyperus rotundus* L. no desenvolvimento de alguns fungos: *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum chardonianum*, *Cylindrocladium scoparium*, *Cylindrosporium* sp., *Diplodia natalensis*, *Fusarium orthoceras*, *Fusicoccum amygdali*, *Pestalotia* sp., *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Rosellinia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*.

O efeito inibidor foi avaliado, medindo-se os diâmetros das colônias ou determinando-se os pêsos secos dos micélios (em *A. niger*) e expresso em porcentagem do controle. Foi também observada a velocidade de esporulação.

O grau de inibição varia com a espécie do fungo submetido ao tratamento, atingindo 100,0% nas mais sensíveis como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici* e *Colletotrichum chardonianum*. A porcentagem de inibição, mesmo nas espécies menos sensíveis como *A. niger* e *Cylindrosporium* sp., atingiu valores superiores a 40% nas concentrações mais altas.

O efeito inibidor foi tanto maior, quanto maior a concentração do extrato utilizado, observando-se em vários casos, uma proporcionalidade perfeitamente linear. As concentrações usadas foram: 10, 20 e 30 ul do extrato bruto ou cromatografado (100 g do material fresco previamente congelado em 200 ml de éter recém destilado e reduzido a 1/20 do volume inicial).

O efeito inibidor pode variar segundo o tempo de tratamento. Em determinados fungos como *Botrytis cinerea*, *Cylindrosporium* sp. e *Rosellinia* sp., a porcentagem de inibição aumentou no decorrer do tempo; em *Diplodia natalensis*, *Fusarium orthoceras* e *Sclerotium rolfsii* houve redução; nos demais, os valores se mantiveram mais ou menos constantes. A concentração mais baixa (10 ul), o efeito decresceu com o tempo na maioria dos casos.

O processo de esporulação foi, de modo geral, retardado.

Foram discutidos alguns dos aspectos relativos à importância da ocorrência de numerosos compostos com atividade inibidora entre os vegetais.

SUMMARY

This paper studies the inhibitory affect of the extract of rhizomes of *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae) on the development of some fungi: *Aspergillus niger* van Tiegh., *Botrytis cinerea* Pers., *Colletotrichum chardonianum* Nolla, *Cylindrocladium scorparium* Morgan, *Cylindrosporium* sp., *Diplodia natalensis* P. Evans, *Fusarium orthoceras* App. et Wr., *Fusicoccum amygdali* Del., *Pestalotia* sp., *Phytophthora capsici* Leon., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Rosellinia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, *Sclerotium rolfsii* Sacc.

All the assays were done using 10, 20 or 30 ul of crude or chromatographed extract obtained from 100 g fresh material poured in 200 ml ether and concentrated to 1/20 its initial volume.

The degree of the inhibition varies with the concentration of the extract and with the species, being the most sensitive: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum chardonianum* with 100% inhibition (30 ul). *Aspergillus niger* is the less sensitive, with 44% inhibition (30 ul).

AGRADECIMENTOS:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo que forneceu auxílio para a aquisição de uma câmara estufa e uma bolsa que permitiu à Maria Vittoria Bonomi tomar parte ativa na realização do presente trabalho.

Ao Instituto Biológico do Estado de São Paulo pelas culturas puras de fungos utilizados.

Ao Sr. João Salvador Furtado, Biologista do Instituto Botânico que identificou o fungo *Cylindrosporium* sp.

À D. Maria José Guimarães do Dept^o de Botânica que cobriu os gráficos a nankim.

Ao Sr. Antônio Previatto pela coleta de rizomas de *Cyperus*.

BIBLIOGRAFIA:

- Agnihotriti*, V. P. — 1963 — Aspergilli from soil — Die Naturwissenschaften, Heft 15: 527.
- Alexopoulos*, C. J. — 1962 — Introductory Mycology — John Wiley & Sons, Inc. N. York. London.
- Byrde*, R. J. W., A. H. Fielding and A. H. Williams — 1960 — Phenolics in Plants in Health and Disease. Pergamon Press, N. York.
- Evenari*, M. — 1961 — Chemical influence of other plantas — In W. Ruhland, Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. XVI: 691-736.
- Fieser*, L. F. y M. Fieser — 1948 — Quimica Orgánica (Edição Espanhola) — Editorial Atlante, S. A. México.
- Gäumann*, E. — 1950 — Principles of Plant Infection — Crosby Lockwood & Son, Ltd. London.
- Heald*, F. D. — 1926 — Manual of Plant Diseases — McGraw-Hill Company, Inc. N. York. London.
- Hemberg*, T. — 1961 — Biogenous inhibitors. Endogenous inhibitors. In W. Ruhland, Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. XIV: 1162-1184. Springer Verlag. Berlin.
- Lilly*, V. G. and H. L. Barnett — 1951 — Physiology of Fungi — McGraw-Hill Book Company, Inc. N. York. Toronto. London.
- 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. Bolet. Botânica, F.F.C.L. U.S.P..
- Meguro*, M. — (no prelo) — Idem anterior. II — Natureza e mecanismo de ação do inibidor. Bolet. Botânica, F.F.C.L. U.S.P.
- Miller*, E. V., C. E. Griffin, T. Schaefer and M. Gordon — 1965 — Two types of growth inhibitors in extracts of *Umbilicaria papulosa*. Bot. Gaz., Vol. 126, nº 2: 100-107.
- Rice*, E. L. — 1965 — Inhibition of Nitrogen-fixing and Nitrifying Bacteria by seed Plants. II — Characterization and identification of Inhibitors. Physiologia Plantarum, Vol. 18: 255-268.
- Shibata*, S. — 1958 — Especial compounds of Lichens. In W. Ruhland, Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. X: 560-623.
- Smith*, I. — 1960 — Chromatographic and Eletrophoretic techniques. Vol. I — Chromatography — Interscience Publishers, Inc. N. York.

Extrato de *Cyperus* no desenvolvimento de fungos. 193

Stakman, E. C. and J. G. *Harrar* — 1957 — Principles of Plant Pathology.
The Ronald Press Company. N. York.

Walker, J. C. — 1950 — Plant Pathology. McGraw-Hill Book Company, Inc.
N. York. Toronto. London.