



**JULIANA PACE SALIMENA**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Dysphania ambrosioides*  
EXTRAÍDO DA INFLORESCÊNCIA NO  
CONTROLE DE *Botrytis cinerea* EM PÓS-  
COLHEITA DE *Rosa hybrida***

**LAVRAS – MG**

**2015**

**JULIANA PACE SALIMENA**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Dysphania ambrosioides* EXTRAÍDO DA  
INFLORESCÊNCIA NO CONTROLE DE *Botrytis cinerea* EM PÓS-  
COLHEITA DE *Rosa hybrida***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Paulo Estevão de Souza

Coorientador

Dr. Fernando Pereira Monteiro

**LAVRAS – MG**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Salimena, Juliana Pace.

Óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* extraído da  
inflorescência no controle de *Botrytis cinerea* em pós-colheita  
de *Rosa hybrida* / Juliana Pace Salimena. – Lavras : UFLA, 2015.  
52 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador(a): Paulo Estevão de Souza.

Bibliografia.

1. *Rosa hybrida*. 2. Mofo cinzento. 3. *Chenopodium  
ambrosioides*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**JULIANA PACE SALIMENA**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Dysphania ambrosioides* EXTRAÍDO DA  
INFLORESCÊNCIA NO CONTROLE DE *Botrytis cinerea* EM PÓS-  
COLHEITA DE *Rosa hybrida***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de junho de 2015.

Dra. Cecília Armesto

UNESP

Dr. Fernando Pereira Monteiro

UFLA

Dr. Paulo Estevão de Souza  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

*Aos meus pais e à minha irmã.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG) pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Agricultura, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao professor Doutor Paulo Estevão, pela orientação e pelos ensinamentos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho.

Ao professor Doutor Fernando, por ter sido não apenas orientador e essencial para a realização de todas as etapas desse trabalho, mas também por ser um grande amigo e conselheiro.

À Annete e ao Luizinho, por toda a paciência e atenção durante os experimentos e análises.

Aos funcionários Paulinho e Dico, por serem sempre gentis e me ensinarem uma diversidade de conhecimentos sobre as plantas do horto e sobre a vida.

A todos os funcionários e colegas da Fitopatologia que me sempre foram prestativos e atenciosos.

Ao meu amigo Wanderley, por tê-lo encontrado nessa caminhada, pelo sorriso iluminado e pela voz profunda que sempre toca meu coração.

À minha amiga Auris, pelas conversas, ora descontraídas, ora sérias, além do ótimo humor de todos os dias!

Ao meu amigo Elisson, por ser um grande conselheiro e por me fazer rir sempre!

À minha amiga Messulan, por me contagiar com sua alegria.

À minha amiga Kris, por me ouvir e me divertir quando eu mais precisava.

À Camila, por ter sido a melhor companhia que eu poderia imaginar para dividir uma casa.

Às amigas, Joice, Patrícia e Tajla, pelo apoio, amizade e palavras de carinho, mesmo à distância.

À Babi e sua mãe, por serem em todos os momentos uma família para mim em Lavras.

*“A diferença entre o remédio e o veneno é a dose”.*

**Paracelso  
(1493 - 1541)**



## RESUMO GERAL

Os óleos essenciais são substâncias complexas naturais biossintetizados por plantas, e muitos deles possuem propriedades antimicrobianas. *Dysphania ambrosioides* é uma planta medicinal tradicionalmente usada como um medicamento anti-helmíntico. Neste estudo, a atividade antifúngica do óleo essencial *D. ambrosioides* foi testada contra *Botrytis cinerea*, que é responsável por grandes perdas econômicas no pós-colheita das rosas. Inflorescências de *D. ambrosioides* produziram 1.3 mg.g<sup>-1</sup> de óleo essencial, correspondente a um teor de 0,13%. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) revelou 11 compostos no óleo essencial, como ascaridol e O-cimeno, correspondente a 80% do total. O óleo essencial reduziu o crescimento micelial de *B. cinerea* em 60% e germinação de esporos em 51% a uma concentração de 1000 ppm. No entanto, não foram observadas alterações morfológicas aparentes em análises de microscopia eletrônica de varredura. O óleo essencial não foi capaz de reduzir o crescimento micelial em pétalas de rosa, mas causou uma mudança de cor nas pétalas 24 h após o tratamento. Embora o óleo essencial tenha pouco potencial para controlar *B. cinerea* em rosas, devido à mudança de cor que provoca, a sua atividade no crescimento micelial e germinação de esporos pode ser explorada em outros patossistemas.

Palavras-chave: *Rosa hybrida*. Mofo cinzento. *Chenopodium ambrosioides*.

## GENERAL ABSTRACT

Essential oils are natural complex substances biosynthesized by plants, with many presenting antimicrobial properties. *Dysphania ambrosioides* is a medicinal plant traditionally used as anthelmintic medication. In this study, the anti-fungal activity of the *D. ambrosioides* essential oil was tested against *Botrytis cinerea*, which is responsible for large economic losses in the post-harvest of roses. *D. ambrosioides* inflorescences produced 1.3 mg.g<sup>-1</sup> of essential oil, correspondent to 0.13%. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) revealed 11 compounds in the essential oil, such as ascaridole and o-cymene, correspondent to 80% of the total. The essential oil reduced mycelial growth of *B. cinerea* in 60% and spore germination in 51% at a concentration of 1000 ppm. However, we observed no apparent morphological alterations in scanning electron microscope. The essential oil was not capable of reducing mycelial growth on rose petals, however causing change in the color of the petals 24 hours after the treatment. Despite the essential oil presenting little potential in controlling *B. cinerea* on roses, due to the change in color it causes, its activity in mycelial growth and spore germination can be explored in other pathosystems.

Keywords: *Rosa hybrida*. Gray mold. *Chenopodium ambrosioides*.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1</b>	<i>Botrytis cinerea</i> (teleomorfo <i>Botryotinia fuckeliana</i> ).....	13
<b>2.2</b>	O cultivo de rosas .....	15
<b>2.3</b>	Óleos essenciais.....	16
<b>2.4</b>	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants e a atividade de seu óleo essencial.....	18
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	22
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> .....	30
	<b>ARTIGO 1</b> Extraction of essential oil from inflorescences of <i>Dysphania ambrosioides</i> and its activity against <i>Botrytis cinerea</i> .....	30

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Fungos fitopatogênicos podem causar perdas econômicas na agricultura (MCDONALD; MCDERMOTT, 1993). Na ausência de hospedeiros e/ou nas condições climáticas desfavoráveis, alguns fungos produzem estruturas de resistência. Uma vez introduzidos em uma área cultivada, constituem um problema de difícil controle, pois, as suas estruturas sobrevivem no solo por vários anos (BUENO et al., 2007). Na agricultura, a alta densidade de plantas está associada a uma maior vulnerabilidade a ataques de pragas e patógenos, especialmente fúngicos (OERKE, 2006).

O fungo *Botrytis cinerea* (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana*) é o agente etiológico do bolor cinzento, doença que afeta centenas de plantas (ELAD et al., 2004). O patógeno pode sobreviver no solo associado à matéria orgânica ou na forma de escleródios. Após a germinação micelial dos escleródios em plantas doentes, ou em restos de plantas infectadas, produz conídios que podem infectar novos hospedeiros (ARAÚJO et al., 2005).

*B. cinerea* é responsável por enormes danos econômicos na pré e pós-colheita de frutos, legumes e plantas ornamentais (QIN et al., 2010). A redução da incidência de *B. cinerea*, pode ser obtida a partir da diminuição do inóculo presente em áreas de cultivo, por práticas de sanitização associadas ao controle biológico (SUSSEL et al., 2011). Atualmente, há uma busca por estratégias que sejam ecologicamente seguras e menos agressivas ao meio ambiente que os produtos químicos convencionais (VERMA; SHARMA; PRASAD, 2009), como por exemplo, a utilização de óleos essenciais no controle de microrganismos fitopatogênicos (DOMINIAK; EKMAN, 2013).

Os óleos essenciais são compostos voláteis, naturais e complexos, caracterizados por um odor forte, e são formados por plantas aromáticas como metabólitos secundários (BAKKALI et al., 2008). Nas plantas estão relacionadas as funções necessárias à sobrevivência vegetal, tendo importância fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000).

As plantas são um grande reservatório de fungicidas naturais, é razoável que existam exemplos que serviriam como alternativas seguras e eficazes aos fungicidas sintéticos. Fungicidas naturais derivados de plantas podem proporcionar uma ampla gama de compostos alternativos aos fungicidas sintéticos, tanto fumigantes, quanto pesticidas de contato (WILSON et al., 1997).

Considerando o grande potencial antifúngico existente nos óleos essenciais, objetivou-se determinar a composição química e o rendimento do óleo essencial extraído da inflorescência de *D. ambrosioides*, e testar sua atividade contra *B.cinerea* em rosas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Botrytis cinerea* (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana*)

O fungo *Botrytis cinerea* (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana*) é o causador de uma enfermidade conhecida como “bolor cinzento”. Esse nome se deve a aparência característica das lesões observadas nos órgãos das plantas. Os sintomas começam como podridões moles, acompanhadas por colapso e encharcamento de tecidos do parênquima, seguido por rápido aparecimento de massas cinzentas de conídios (WILLIAMSON et al., 2007).

*Botrytis cinerea* é um importante patógeno de plantas de viveiro e campo, resultando em perdas consideráveis de flores de corte, com sintomas muitas vezes progredindo durante o armazenamento e transporte (ELAD et al., 2004; GOSS; MAZARURA, 2013). *B. cinerea* pode atacar mais de 200 espécies hospedeiras em todo o mundo, e é responsável por podridões em diferentes órgãos de plantas, incluindo flores, frutos, folhas, brotos e raízes (WILLIAMSON et al., 2007).

As rosas são altamente susceptíveis a *B. cinerea*. O processo de infecção se inicia com a germinação do conídio na superfície da pétala, posteriormente ocorre a penetração no tecido do hospedeiro (HAMMER; EVENSEN, 1994). A doença se inicia com lesões marrons de até 2 mm de diâmetro, seguida de difusão da necrose. Os sintomas incluem o escurecimento e apodrecimento das pétalas, o que afeta a qualidade e resulta em perdas econômicas para os produtores (GOSS; MAZARURA, 2013; HAMMER; EVENSEN, 1994). *B. cinerea* tem coevoluído com as rosas ao longo dos anos. O homem estimulou sua diversificação através da introdução de plantas em novos habitats e transportando junto com elas o patógeno de um lugar para outro (BARBIERI; CARVALHO, 2001).

O desenvolvimento de *B. cinerea* depende de água e baixas temperaturas (ELAD et al., 2004). Em rosas, períodos superiores a 8 horas, com umidade relativa acima de 90% e temperaturas entre 15 e 20°C, ou mais de 16 horas com 90% de umidade relativa e temperaturas superiores a 15°C, são favoráveis para incidência de bolor cinzento (ARAÚJO et al., 2015). Práticas culturais que reduzem a umidade são capazes de suprimir a doença. O aumento do espaçamento entre as plantas reduz a incidência e a suscetibilidade do produto colhido (ELAD et al., 2014).

A implementação de medidas de controle no campo deve levar em conta o conhecimento sobre as condições favoráveis para a infecção por *B. cinerea*. Considerando as perdas durante o transporte e armazenamento, é importante determinar a capacidade do patógeno em causar danos às rosas de corte sob baixas temperaturas, incluindo em infecções latentes. A redução do nível de stress fisiológico das pétalas de rosas pode resultar na redução de perdas para o bolor cinzento (ARAÚJO et al., 2015.)

Devido a sua plasticidade genética, muitos fungicidas não conseguiram controlar este patógeno (WILLIAMSON et al., 2007) e foram relatadas várias ocorrências de resistência (GEPP et al., 2012; LEROCH et al., 2013; WESSELS et al., 2013). A descoberta de novos compostos ativos como ciprodinil anilino, pirimidinas, pirimetanil, mepanipirime, fludioxonil (fenilpirrol), e apenas recentemente, o fenexamida, hidroxianilina em conjunto com os convencionais, tais como o dicarboximidas e tolilfluanida, tem permitido a implementação de estratégias eficazes aplicadas na gestão anti-resistência (ROSSLENBROICH; STUEBLER, 2000).

São necessárias novas técnicas de manejo para o controle de *B. cinerea*, não apenas devido a sua resistência a fungicidas, mas também pela pressão regulatória sobre resíduos e preocupações com a saúde humana e ambiental (JACOMETI et al., 2010). Esforços consideráveis são investidos na proteção da

produção agrícola contra *Botrytis* antes e no pós-colheita. O mercado de produtos fungicidas destinado ao controle desse patógeno tem sido cerca de 20-25 milhões de dólares nos últimos anos (ELAD et al., 2004).

## 2.2 O cultivo de rosas

Na família *Rosaceae* estão incluídos ervas, arbustos e árvores, composta por 95 a 100 gêneros e cerca de 2830 a 3100 espécies. O gênero *Rosa* destaca-se entre as plantas ornamentais devido a sua importância econômica e a área cultivada ainda em crescente expansão. A rosa é admirada desde a antiguidade por sua beleza e fragrância e tem múltiplos usos: flores de corte, paisagismo, óleos (essência de rosa) para perfume, bem como o uso culinário (água de rosas), e frutos como uma fonte de vitamina C (FOLTA; GARDINER, 2009).

A floricultura é um setor que movimenta mundialmente cerca de U\$ 16 bilhões, valor que atinge cerca de U\$ 48 bilhões junto ao consumidor final. Considerado como um negócio emergente e de elevada lucratividade, esse comércio está em crescente expansão, fato também observado no Brasil (MARTINS, 2009).

Há alguns anos o interesse pela floricultura evidenciou-se no mercado nacional, ocupando um lugar de destaque no cotidiano brasileiro (LANDGRAF; PAIVA, 2009). No Brasil, a cultura da roseira ocupa extensas áreas de plantio e confere uma das maiores receitas por produto. A floricultura abrange produção e comercialização de flores e plantas ornamentais, destinadas ao corte ou ao envasamento, incluindo plantas não floríferas, folhagens, bulbos, mudas, árvores de grande porte e espécies nativas usadas em projetos paisagísticos ou para recuperação de áreas degradadas (MARTINS, 2009).

No estado de Minas Gerais, a produção de flores de corte é uma atividade realizada por 188 produtores, e sua área plantada é de



aproximadamente 291 ha. A produção é vendida para todo o Brasil e também exportada para países da Europa, Ásia e América do Norte. Entre as principais espécies cultivadas no estado está a rosa (LANDGRAF; PAIVA, 2009).

O consumo de flores do mercado interno ainda não está consolidado, mas existem oportunidades de mercado em outros países. Por ser uma carga perecível, em caso de atraso no transporte podem ocorrer perdas (ANEFALOS; CAIXETA-FILHO, 2007). As distâncias entre as áreas de produção de flores de corte e mercados consumidores são extensas. Rosas de países da América do Sul são transportadas para os EUA ou Europa. Atualmente, devido a questões de sustentabilidade e redução de custos, existe a preferência pelo transporte de flores em *containers* via mar. Embora o transporte de longa distância seja realizado a baixas temperaturas, o desenvolvimento de *Botrytis* ainda é uma grande ameaça quando os mercados consumidores estão distantes (HARKEMA et al., 2013).

Nas regiões produtoras de rosas, geralmente ocorrem diversos problemas fitossanitários, destacando-se as doenças fúngicas na parte aérea, como o míldio, o oídio e o mofo cinzento, causado pelo fungo *Botrytis cinerea* (HORST, 1998).

O mercado de rosas sofre grandes perdas econômicas devido a doenças, desde a colheita até o consumidor final. O uso de óleos essenciais representa uma nova alternativa aos fungicidas sintéticos em doenças de pós-colheita (KOUASSI et al., 2010; VITORATOS et al., 2013).

### **2.3 Óleos essenciais**

Os óleos essenciais são metabólitos secundários encontrados naturalmente em plantas e se caracterizam por serem misturas complexas e voláteis (KALEMBA; KUNICKA, 2003). São encontrados em flores, frutos,

sementes, galhos, cascas e raízes (BURT, 2004). Os óleos essenciais (OE) são extraídos de plantas através da técnica de arraste a vapor, e por prensagem do pericarpo de frutos cítricos. São compostos principalmente de mono e sesquiterpenos, e de fenil-propanóides, metabólitos que conferem suas características organolépticas (BIZZO et al., 2009) e propriedades biológicas de plantas aromáticas e medicinais (KALEMBA; KUNICKA, 2003).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como antibacterianos, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo o apetite por tais plantas. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis (BAKKALI et al., 2008).

Óleos voláteis obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, caracteres físico-químicos e odores bem distintos (SIMÕES et al., 2010). A idade da planta também influencia a composição química e o teor (CHAGAS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012), até mesmo os constituintes majoritários podem variar conforme a época de colheita (Bezerra et al., 2008), condições climáticas e solo (SIMÕES et al., 2010).

Determinadas plantas possuem óleo essencial ou seus constituintes, com um amplo espectro de atividade contra fitopatógenos. Possuem potencial considerável como protetores de culturas e para o manejo de pragas (ISMAN, 2000). A atividade antifúngica dos óleos essenciais já está bem documentada, existindo estudos de seus efeitos em patógenos incidentes em pós-colheita (REUVENI et al., 2008).

No estudo de Tian et al. (2011) foi utilizado o óleo essencial extraído dos frutos de *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata*. Os autores destacaram que o óleo essencial tem potencial para ser usado como fumigante

durante a armazenagem e transporte, e pode melhorar a segurança dos alimentos, eliminando propagação de fungos sem deixar resíduos detectáveis após o armazenamento.

Elshafie et al. (2015) relataram que os compostos carvacrol e timol constituintes do óleo essencial de *Origanum vulgare* L., apresentaram alta atividade antifúngica contra espécies de *Monilinia*, responsáveis por perdas significativas no pós-colheita de peras.

Znini et al. (2013) utilizando o óleo essencial de *Pulicaria mauritanica* Coss. sob a forma de vapor, controlaram eficientemente o crescimento micelial de *Alternaria* sp., *Penicillium expansum*, e *Rhizopus stolonifer*, todos isolados de maçãs, o que sugere que podem ser usados como protetores na pós-colheita desses frutos.

Nongmaithem (2014), utilizando o óleo essencial de *Azadirachta indica*, inibiram o crescimento de *Pestalotia psidii*, *Gloesporium psidii*, *Rhizoctonia solani* (T3), *Fusarium* sp., *Alternaria alternata* e *Geotrichum candidum*, todos isolados de frutos de goiabeira. O autor acrescenta que o óleo essencial da planta pode ser utilizado como tratamento em programas de manejo em pós-colheita, eliminando a propagação de fungos.

#### **2.4 *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants e a atividade de seu óleo essencial**

Conhecida popularmente como mastruz ou erva-de-santa-maria (MESSIAS et al., 2015), *D. ambrosioides*, anteriormente, pertencia ao gênero *Chenopodium*, um táxon grande e morfológicamente variável de ervas anuais e perenes (FUENTES-BAZAN et al., 2012).

*D. ambrosioides* está inserida na família *Chenopodiaceae*, cujas plantas são resistentes a seca e salinidade, e conseguem se desenvolver bem em solos

com poucos nutrientes, o que as torna pioneiras na colonização de ambientes (ZHANG et al., 2012). Estudos moleculares sugerem que a família *Amaranthaceae* deve incluir a família *Chenopodiaceae*. Isso a tornaria uma família com cerca de 170 gêneros e 2000 ou mais espécies (HARWOOD; PALMER, 2011).

As folhas de *D. ambrosioides* possuem cinco lobos, de coloração verde pálido com borda dorsal serrilhada, não claramente definida. As sementes são marrons com ponta chanfrada (GROZEVA; CVETANOVA, 2013). Por razões morfológicas foi expandida a circunscrição do gênero *Dysphania*, compreendendo todos os táxons glandulares de *Chenopodium*. A mudança do conceito do gênero foi confirmada por dados moleculares e tornou-se amplamente aceita (VERLOOVE, 2013).

*D. ambrosioides* é usada na medicina tradicional como vermífugo (MEDEIROS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2010; PINTO et al., 2006), antibiótico e expectorante (SOUZA; FELFILI, 2007). Em ensaios de toxicidade realizados por Silva et al. (2014), os resultados indicaram que o extrato aquoso das folhas de *C. ambrosioides* produzem lesões ligeiramente hepatotóxicas em ratos. Segundo Okuyama et al. (1993), o ascaridol, principal constituinte químico do óleo essencial, é responsável pela toxicidade observada em cobaias, além de ocasionar sintomas de hipotermia e atividade locomotora diminuída.

O óleo essencial de *D. ambrosioides* possui potencial como protetor em pós-colheita, como relatado por Chu et al. (2011), que o extraíram da parte aérea da planta, tendo seis compostos isolados, dentre os quais (*z*)-ascaridole, que mostrou forte atividade como fumigante contra adultos de *Sitophilus zeamais* Mots., o gorgulho do milho.

*D. ambrosioides* também possui em seu óleo essencial, propriedades fungitóxicas (CHEKEM et al., 2010; JARDIM et al., 2008; KUMAR et al., 2007; ) e como observado nos ensaios de Tripathi et al. (2004), o óleo essencial

a uma concentração de 500 ppm apresentou toxicidade contra *Penicillium italicum*, com inibição de 100% do crescimento micelial.

Foram identificados no óleo essencial de *D. ambrosioides*, os seguintes compostos:  $\alpha$ -terpineno (CHEKEM et al., 2010; JARDIM et al., 2008; TAPONDJOU et al., 2002), ascaridol (CHEKEM et al., 2010; TAPONDJOU et al., 2002), *cis*- $\beta$ -farnesen (TAPONDJOU et al., 2002), álcool benzílico, p-Cresol, p-Mentha-1,3,8-trieno, p-Cimen-8-ol (Z)-Ascaridol, Piperitona, (E)-Ascaridol, (E)-Piperitol acetato, (Z)-Carvil acetato (JARDIM et al., 2008),  $\beta$ -felandreno, Dehidro-p-cimeno, L-carvacrol, d-limoneno (p-mentha-1,8-dieno), oxido de piperitona, Isoascaridol (CHEKEM et al., 2010), p-cimeno (HAMMER et al., 2003; KORDALI et al., 2008; ŠEGVIĆ-KLARIĆ et al., 2007), carvacrol (2) (KORDALI et al., 2008),  $\alpha$ -Terpineol  $\alpha$ -pineno, limoneno,  $\gamma$ -terpineno (HAMMER et al., 2003), timol, (KORDALI et al., 2008; ŠEGVIĆ-KLARIĆ et al., 2007).

Os compostos que possuem ação comprovadamente fungitóxica são: p-cimeno (HAMMER et al., 2003; KORDALI et al., 2008; ŠEGVIĆ-KLARIĆ et al., 2007), carvacrol (KORDALI et al., 2008),  $\alpha$ -Terpineol,  $\alpha$ -pineno, limoneno,  $\gamma$ -terpineno (HAMMER et al., 2003), timol (KORDALI et al., 2008; ŠEGVIĆ-KLARIĆ et al., 2007) e todos os ascaridols (JARDIM et al., 2008).

No estudo de Kordali et al. (2008), carvacrol e o timol, presentes no óleo essencial *Origanum acutidens*, inibiram completamente o crescimento micelial de dezessete fungos testados, incluindo *Botrytis* sp. Nesse mesmo estudo, observou-se que p-cimeno mostrou baixa atividade antifúngica contra *Fusarium acuminatum* e *Pythium ultimum*. Embora *Candida* sp. não seja um fungo relacionado a danos em pós-colheita, em Pina-Vaz et al. (2004), carvacrol, timol e p-cimeno, apresentaram atividade fungicida marcante.

Em Couladis et al. (2004), timol apresentou grande potencial fungicida contra *Aspergillus* spp., *Penicillium* sp., *Phomopsis helianthi*, *Trichoderma*

*viride*, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium canis* e *Epidermophyton floccosum*, segundo os autores, existe a possibilidade de usá-lo para a preservação de alimentos. Ensaios *in vitro* realizados por Zhou et al. (2014) mostraram a eficácia de  $\alpha$ -terpineol contra fungo *Geotrichum citri-aurantii*, um dos principais patógenos no pós-colheita em citros.

Em Jardim et al. (2008) sugere-se que os ascaridoles são os principais componentes fungitóxicos encontrados no óleo essencial de *D. ambrosioides*, no entanto, acreditam que a fungitoxicidade pode envolver componentes em menor concentração que atuariam com efeitos sinérgicos. Como relatado por Jardim et al. (2010) foi encontrado no extrato hexânico de *D. ambrosioides*, o composto (Z) –ascaridol, responsável por inibir o crescimento de *Aspergillus flavus*, *A. glaucus* e *A. ochraceous* (grãos armazenados e deterioração de alimentos); *Fusarium semitectum*, *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *A. niger* (podridão pós-colheita de frutas e vegetais tropicais) e *C. musae* (antracnose da banana).

O óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* possui propriedades fungicidas e fungitóxicas. Assim, ainda existe um potencial inexplorado do óleo essencial em pós-colheita.

## REFERÊNCIAS

- ANEFALOS, L. C.; CAIXETA-FILHO, J. V. Avaliação do processo de exportação na cadeia de flores de corte utilizando modelo insumo-produto. **Revista Brasileira de Economia**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 2, p. 153-173, abr./jun. 2007.
- ARAÚJO, A. E. de et al. Infection of rose flowers by *Botrytis cinerea* under different temperatures and petal wetness. **African Journal of Agricultural Research**, Nigéria, v. 10, n. 8, p. 835-839, Feb. 2015.
- ARAÚJO, A. E. et al. Survival of *Botrytis cinerea* as mycelium in rose crop debris and as sclerotia in soil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 516-521, Sept./Oct. 2005.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 2, p. 79-83, maio/ago. 2001.
- BEZERRA, A. M. E. et al. Produção e composição química da macela em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 26-29, jan./mar. 2008.
- BIZZO, H. R. et al. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BUENO, C. J. et al. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 47-55, jan./mar. 2007.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.
- CHAGAS, J. H. et al. Produção de biomassa e teor de óleo essencial em função da idade e época de colheita em plantas de hortelã-japonesa. **Acta Scientiarum**. Maringá, v. 33, n. 2, p. 327-334, 2011.

CHEKEM, M. S. G. et al. Antifungal properties of *chenopodium ambrosioides* essential oil against *candida* species. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 3, n. 9, p. 2900-2909, Sept. 2010.

CHU, S. S. et al. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 67, n. 6, p. 714–718, June 2011.

COULADIS, M. et al. Chemical analysis and antifungal activity of *thymus striatus*. **Phytotherapy Research**, London, v. 18, n. 1, p. 40-42, Jan. 2004.

DEMBITSKY, V. et al. Ascaridole and related peroxides from the genus *chenopodium*. **Polythematical Collected Reports of the Medical Faculty of the Palacky University, Olomouc, Czechoslovakia**, Prague, v. 152, n. 2, p. 209–221, Dec. 2008.

DOMINIAK, B. C.; EKMAN, J. H. The rise and demise of control options for fruit fly in Australia. **Crop Protection**, Guildford, v. 51, p. 57-67, Sept. 2013.

ELAD, Y. et al. **Botrytis: biology, pathology and control**. Netherlands: Springer Netherlands, 2004. 428 p.

ELAD, Y. et al. Conditions influencing the development of sweet basil grey mould and cultural measures for disease management. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, p. 67–77, Oct. 2014.

ELAD, Y. Latent infection of *Botrytis cinerea* in rose flowers and combined chemical and physiological control of the disease. **Crop Protection**, Guildford, v. 7, p. 361-366, Dec. 1988.

ELSHAFIE, H. S. et al. Antifungal activity of some constituents of *origanum vulgare* l. essential oil against postharvest disease of peach fruit. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, p. 1-6, Jan. 2015.

FUENTES-BAZAN, S. et al. A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium* sensu lato, and a tribal rearrangement of *Chenopodioideae* (*Chenopodiaceae*). **Willdenowia**, Berlin, v. 42, n. 1, p. 5-24, June 2012.

FOLTA, K. M.; GARDINER, S. E. (Ed.). **Genetics and genomics of rosaceae, plant genetics and genomics: crops and models 6**. New York: Springer New York, 2009. 411 p.



GEEP, V. et al. Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. **Agrociencia Uruguay**, Montevideo, v. 16, n. 1, p. 97-107, June 2012.

GOSS, M.; MAZARURA, U. Efficacy of post-harvest fungicide sprays and fan-drying for the control of gray mould (*Botrytis cinerea*) in roses (*Rosacea hybridus* var. annabella). **Journal of Agricultural Technology**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 413-420, 2013.

GROZEVA, N. H.; CVETANOVA, Y. G. Karyological and morphological variations within the genus *dysphania* (chenopodiaceae) in Bulgaria. **Acta Botanica Croatica**, Zagreb, v. 72, n. 1, p. 49-69, 2013.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 464-472, abr./jun. 2011.

HAMMER, K. A. et al. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 4, p. 853–860, Oct. 2003.

HAMMER, P. E.; EVENSEN, K. B. Differences between rose cultivars in susceptibility to infection by *Botrytis cinerea*. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 84, n. 11, p. 1305-1312, 1994.

HARKEMA, H. et al. Reduction of *Botrytis cinerea* incidence in cut roses (*Rosa hybrida*L.) during long term transport in dry conditions. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 76, p. 135–138, 2013.

HARWOOD, R.; PALMER, J. Flora of the Darwin Region. **Darwin Region**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 01-23, 2011.

HORST, R. K. **Compêndio de enfermidades de rosas**. Quito: Universal, 1998. 50 p.

ISMAN, B. M. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, n. 8–10, p. 603–608, Sept. 2000.

JACOMETTI, M. A. et al. Review: alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 16, n. 1, p. 154–172, Feb. 2010.

JARDIM, C. M. et al. Chemical composition and antifungal activity of the hexane extract of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, n. 10, p. 1814-1818, 2010.

JARDIM, C. M. et al. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, n. 9, p. 1213-1218, Sept. 2008.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 10, n. 10, p. 813-829, May 2003.

KORDALI et al. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, Barking, v. 99, n. 18, p. 8788-8795, Dec. 2008.

KOUASSI, K. H. et al. Evaluation of three essential oils as potential sources of botanical fungicides. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, Gent, v. 75, n. 4, p. 525-529, 2010.

KUMAR, R. et al. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 2 p. 159-164. Abr. 2007.

LANDGRAF, P. R. C.; PAIVA, P. D. O. Produção de flores cortadas no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 120-126, jan./fev. 2009.

LANDGRAF, P. R. C.; PAIVA, P. D. Produção de mudas para jardim no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 127-131, jan./fev. 2009.

LEROCH, M. et al. Gray mold populations in german strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 79, n. 1 p. 159-167, Jan. 2013.

MARTINS, M. V. M. Produção integrada de flores no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 249, p. 64-66, 2009.

MCDONALD, B. A.; MCDERMOTT, J. M. Population genetics of plant pathogenic fungi. **BioScience**, Washington, v. 43, n. 5, p. 311-319, May 1993.

MEDEIROS, M. F. T. et al. Plantas medicinais e seus usos pelos sítios da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 18, n. 2, p. 391-399, 2004.

MESSIAS, M. C. T. B. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 17, n. 1, p. 76-104, jan./mar. 2015.

NONGMAITHEM, N. Control of post-harvest fungal diseases of guava by essential oil of *Azadirachta indica*. **Indian Journal of Hill Farming**, Meghalaya, v. 27, n. 1, p. 135-139, 2014.

OERKE, E.-C. Centenary review: crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**. Cambridge, v. 144, n. 1, p. 31-43, 2006.

OKUYAMA, E. et al. Ascaridole as a pharmacologically active principle of “Paico”, a medicinal Peruvian plant. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 41, n. 7, p. 1309-1311, 1993.

OLIVEIRA, A. R. M. F. et al. Influência da idade da planta na produção de óleo essencial de alevante. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 2, p. 241-245, mar./abr. 2012.

OLIVEIRA, H. B. et al. Estudo etnofarmacológico de plantas medicinais utilizadas em Rosário da Limeira, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 256-260, abr./maio 2010.

PINA-VAZ, C. et al. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 73-78, Jan. 2004.

PINTO, E. P. P. et al. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 751-762, out./dez. 2006.

QIN, G. et al. Inhibitory effect of boron against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanisms of action. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 38, n. 1-2, p. 145-150, Mar. 2010.

REUVENI, R. et al. Fungistatic activity of essential oils from *Ocimum basilicum* Chemotypes. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 110, n. 1, p. 20-22, May 2008.

ROSSLENBROICH, H. J.; STUEBLER, D. *Botrytis cinerea*: history of chemical control and novel fungicides for its management. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, n. 8-10, p. 557-561, Sept. 2000.

ŠEGVIC-KLARIC, M. et al. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 36-42, Jan. 2007.

SILVA, M. G. et al. Acute and sub-chronic toxicity of aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides* leaves in rats. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 17, n. 9, p. 979-984, Sept. 2014.

SIMÕES, S. C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS/UFSC, 2010. 1104 p.

SIQUI, A. C. et al. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, v. 16, p. 38-43, 2000.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 135-142, jan./mar. 2006.

SUSSEL, A. A. B. et al. Incidência e severidade do mofo-cinzeno-da-mamoneira sob diferentes temperaturas, períodos de molhamento e concentração de conídios. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 1, p. 30-34, jan./mar. 2011.

TAPONDJOU, L. A. et al. Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 395-402, 2002.

TIAN, J. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 2-3, p. 464-470, Feb. 2011.

TORRES, A.R. et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 15, n. 4, p. 373-380, out./dez. 2005.

TOSI, B. et al. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. **Phytotherapy Research**, London, v. 10, n. 4, p. 335-336, June 1996.

TRIPATHI, P. et al. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants in management of post-harvest rotting of citrus fruits. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 317–321, Apr. 2004.

VERLOOVE, F. A new combination in Oxybasis (Amaranthaceae). **New Journal of Botany**, New York, v. 3, n. 1, p. 59-60, 2013.

VERMA, M.; SHARMA, S.; PRASAD, R. Biological alternatives for termite control: a review. **International Biodeterioration Biodegradation**, Barking, v. 63, n. 8, p. 959-972, Dec. 2009.

VITORATOS, A. et al. Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, România, v. 41, n. 1, p. 86-92, 2013.

WESSELS, B. A. et al. Characterization of genetic variation and fungicide resistance in *Botrytis cinerea* populations on rooibos seedlings in Western Cape of South Africa. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 136, n. 2, p. 407-417, June 2013.

WILLIAMSON, B. et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 561–580, Sept. 2007.

WILSON, C. L. et al. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 2, p. 204-210, Feb. 1997.

ZHANG, W. H. et al. Assessment of bacterial communities and characterization of lead-resistant bacteria in the rhizosphere soils of metal-tolerant *Chenopodium ambrosioides* grown on lead-zinc mine tailings. **Chemosphere: chemistry, physics and biology as focused on environmental problems**, v. 87, n. 10, p. 1171-1178, June 2012.

ZHOU, H. et al. Antifungal activity of citral, octanal and  $\alpha$ -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. **Food Control**, Guildford, v. 37, p. 277–283, Mar. 2014.

ZNINI, M. et al. Essential oil composition and antifungal activity of *Pulicaria mauritanica* Coss., against postharvest phytopathogenic fungi in apples. **Food Science and Technology**, London, v. 54, n. 2, p. 564–569, Dec. 2013.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**ARTIGO 1** Extraction of essential oil from inflorescences of *Dysphania ambrosioides* and its activity against *Botrytis cinerea*

**Submetido na revista Journal of Medicinal Plants Research –  
Qualis B1**

**Em 22 de Janeiro de 2015**

**Código do Manuscrito : JMPR/17.01.15/5743**

**Juliana Pace Salimena<sup>1</sup>; Fernando Pereira Monteiro<sup>1,2</sup>; Paulo  
Estevão de Souza<sup>1,2</sup>; Jorge Teodoro de Souza<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Agriculture, Lavras Federal University, 37200-000  
Lavras, MG, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Phytopathology, Lavras Federal University.

**Correspondence:** Fernando Pereira Monteiro  
Lavras Federal University, Phytopathology Department, P.O. Box  
3037, 37200-000 Lavras, MG, Brazil.  
Phone: +55 35 9963 4839  
E-mail: monteirofp1985@gmail.com

## ABSTRACT

Essential oils are natural complex substances biosynthesized by plants and many of them have antimicrobial properties. *Dysphania ambrosioides* is a medicinal plant traditionally used as an anthelmintic medicine. In this study the antifungal activity of *D. ambrosioides* essential oil was tested against *Botrytis cinerea*, which is responsible for large economic losses in the post-harvest of roses. Inflorescences of *D. ambrosioides* yielded  $1.3\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  of essential oil, corresponding to a content of 0.13%. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) revealed 11 compounds in the essential oil with ascaridol and Ocymene corresponding to 80% of the total. The essential oil reduced *B. cinerea* mycelial growth by approximately 60% and spores germination by 51% at the concentration of 1000ppm. However, no apparent morphological changes were observed in scanning electron microscopy analyzes. The essential oil was not able to reduce mycelial growth on rose petals, but caused a color change in the petals 24 h after the treatment. Although the essential oil has little potential to control *B. cinerea* on roses due to the color change it causes, its activity on mycelial growth and spores germination could be exploited in other pathosystems.

**Keywords:** *Rosa hybrida*, Grey mold, *Chenopodium ambrosioides*



## INTRODUCTION

Essential oils are natural plant products also known as volatile oils. They are fragrant substances with an oily consistency composed of a complex mixture of volatile molecules that may have multiple antimicrobial properties (Bassolé & Juliani, 2012). Some essential oils have activity not only by direct contact but also through the vapor phase, suggesting their use as fumigants. The use of fumigants avoids the direct contact with plants protecting them from possible harmful effects and ensures more security to the consumers (Shao et al., 2013; Umpiérrez et al., 2012).

*Dysphania ambrosioides* (Chenopodiaceae sin. *Chenopodium ambrosioides*) is a medicinal plant mainly used in folk medicine against intestinal parasites since immemorial times. The plant is native to Central and South America and has an annual or perennial cycle depending on the natural variety. This herb has a marked odor and is popularly known as wormseed, mastruz, goosefoot, paico or epazote (Lorenzi & Matos, 2002; Ortega-Ramirez et al., 2014). *D. ambrosioides* essential oil has toxic effects against fungi (Cabral et al., 2013), bacteria (Liu et al., 2013) and nematodes (Salifou et al., 2013; Vita et al., 2014).

The major compounds found in the essential oil of *D. ambrosioides* are p-cymene, carvacrol, isoascaridole and ascaridoles (Monzote et al., 2014; Ávila-Blanco et al., 2014). The ascaridoles are the main responsible for its activity against fungi, including plant pathogens (Jardim et al., 2008; Zabka et al., 2009; Nisar et al., 2013). The development of natural fungicides with ascaridoles is encouraging due to its broad range of activity against several plant pathogens (Jardim et al., 2008). Other compounds in the oil may play a significant role in disease control because the complete essential oil has better activity in comparison with its pure major compounds (Monzote et al., 2014).

The essential oil of *D. ambrosioides* may be used as a natural fungicide in postharvest protection of agricultural commodities, such as cut flowers (Jardim et al., 2008). The distances among cut flowers producing areas and consumer markets may be very long. Roses (*Rosa hybrida*) from South

American countries are transported to the USA or Europe, while roses from Kenya and Ethiopia are transported via Western Europe to Eastern Europe and Asian countries (Harkema et al., 2013). Even at low transportation temperatures the roses may be damaged by fungi (Tuset, 1987).

The rose trade has great economic importance to Brazil. However, its competitiveness in the world market is greatly affected by the lack of research and improvement in areas such as resistance to pathogens (Barbieri & Stumpf, 2005). Roses are specially harmed by *Botrytis cinerea* (teleomorph: *Botryotinia fuckeliana*) that may attack more than 200 host species worldwide. Many fungicides have failed to control this pathogen due to its genetic plasticity (Williamson et al., 2007).

Excessive spraying of conventional chemicals used to control pests may harm the environment. Opposite to this view, there is a search for environmentally safe alternatives (Verma et al., 2009). Farmers have been using a variety of strategies against plant pathogens (Dominiak & Ekman, 2013). In addition, plant-derived compounds such as essential oils could also be applied.

The aims of this study were to determine the chemical composition and yield of the essential oil extracted from inflorescences of *D. ambrosioides* and test its activity against *B. cinerea* pathogenic to roses. No previous reports were found on the use of *D. ambrosioides* essential oil in the control of rose diseases.

## MATERIALS AND METHODS

### *Dysphania ambrosioides* cultivation

*Dysphania ambrosioides* were grown in tissue culture on the basis of the standard procedures (Gangopadhyay et al., 2002). Five seedlings of approximately 5mm long were inserted in a glass bottle containing MS basal medium (Murashige & Skoog, 1962) without hormone addition. The bottles remained for 40 days in a growth chamber with a photoperiod of 16h of light and 8h of darkness and temperature between 25 and 28°C. After this incubation period, the seedlings were transferred to a greenhouse and were acclimated for two weeks. After the acclimation, plants were transferred to boxes measuring 16m long x 1.4m wide x 1.1m high filled with coarse sand and irrigated with a nutrient solution adjusted to pH 5.7±0.1 (Table 1). Plants were cultivated for 60 days in the sand box and harvested at flowering in May 20, 2014, at 9am in a mild day with no rainfall. The voucher specimen is deposited in the Biology Department herbarium of Lavras Federal University under accession number 10137.

**Table 1** – Composition of the nutrient solution used to fertilize *D. ambrosioides* in this study.

Mineral source	mg/L
Calcium nitrate	760
Ammonia surfate	255
Monoammonium phosphate (MAP)	110
Potassium chloride	400
Magnesium sulfate	375
FeEDDHMA (6% Fe)	44
Manganese sulfate	6.7
Boric acid	3.28
Zinc sulfate	2.96
Copper sulphate	0.36
Sodium molybdate	0.05

## Essential oil extraction and chemical composition

Essential oil extraction was performed by steam distillation (Marconi MA480). One hundred grams of fresh inflorescence were used for extraction. The hydrolact was collected after 90min and the essential oil was purified by liquid-liquid partition with 25mL dichloromethane for three times. Organic fractions were combined and dried with anhydrous magnesium sulfate. The salt was removed by simple filtration and solvent was evaporated at room temperature in a gas exhaust chapel until constant weight.

After extraction of the essential oil each flask was transferred to amber glass bottles with stoppers and screw caps and weighed with an analytical balance (Marte Científica, Model AL500). Essential oil content was calculated with the following formula:  $\text{Content (\%)} = (\text{essential oil mass (g)} \times 100) / \text{fresh plant material weight (g)}$ .

The analysis of chemical composition was done in triplicate. The quantitative analyzes were performed by chromatography coupled with a flame ionization detector hydrogen (GC-FID) and Agilent® 7890A system equipped with a fused silica capillary column gas-phase HP-5 (30m long x 0.25mm inside diameter x 0.25mm thick film).

Helium was used as carrier at a flow of 1.0 mL/min. Injection and detection temperatures were maintained at 220°C and 240°C, respectively. Initial oven temperature was 40°C followed by a temperature ramp of 3°C/min up to 200°C and 10°C/min up to 250°C. The essential oil was diluted with 1% ethyl acetate and 1µL injected into the chromatograph using the split mode at 1:50. Quantitative analysis was obtained by integrating the total ion chromatogram and the content of the eluted constituents expressed as percentage of peak relative area.

Qualitative analyzes were done by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) with an Agilent® 5975C. This is operated in scan mode by electronic impact ionization at 70 eV at the speed of 1.0 scan/s and mass acquisition interval of 40-

400 m/z. The chromatographic conditions were identical to the ones used in the quantitative analyzes.

The components were identified by comparing their calculated Kovats retention indices ( $IK_c$ ) with retention indices (IK) reported in the literature (Adams, 2007; Kováts, 1965) and by mass spectral comparisons.  $IK_c$  were calculated by applying the equation of Van Den Dool and Kratz (1963) on the basis of standard n-alkanes co-injection C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> (Sigma Chemical Co.).

### **Effects of the essential oil on *Botrytis cinerea***

*Botrytis cinerea* was obtained from the CML mycological collection (Lavras Federal University, accession number 2317). Spores were produced on PDA medium at 25°C for eight days and suspensions were adjusted to  $2 \times 10^5$  spores/mL. Spore suspensions with this concentration were used in all experiments described below.

Petri dishes divided in two sections were used to assess mycelial growth after treatment with the essential oil. On the center of one section containing 10mL of PDA, an aliquot of 2 $\mu$ L of the conidial suspension was added. In the other section a cotton plug of approximately 0.16g moistened with 1mL of a mixture of essential oil at 250, 500, 750 and 1000 ppm dissolved in 3% water-polysorbate (Tween 80) was placed. These cotton plugs were used to allow volatile dissipation for a long period of time. The controls were sterile distilled water-polysorbate at 3% in one section and the fungal spores in the other. The mycelial radial diameter was measured every 24h up to 96h. Mycelial growth rate was calculated according to Oliveira (1991):  $MGR = \sum(D - D_p) / N$  where MGR=mycelial growth rate (cm.day<sup>-1</sup>), D=current average diameter (cm), D<sub>p</sub>=previous day average diameter (cm), and N=number of days after spore deposition. All experiments were installed in a completely randomized design with three replicates.

The effect on spore germination was assessed by using Petri plates divided in two sections. In one section containing 10mL of 2% water-agar, 2mL of the conidial suspension described above was added onto the medium surface. In the other section, a cotton

plug moistened with 1mL of a solution composed of 1% essential oil and 3% water-polysorbate was added. Control plugs were treated with 1mL of water-polysorbate. Spores germination was evaluated every 24h up to 96h. Each treatment was assessed by adding 100 $\mu$ L onto microscope slides and four randomized fields were assessed. Counting was repeated five times per treatment. The first 100 randomly selected conidia were counted and discriminated in germinated or non-germinated.

Scanning electron microscopy analyses were done on cultures grown for 3 days at 25°C in the presence of 1% essential oil either on cotton plugs as described above or with 100 $\mu$ L applied directly onto the surface of the medium. Observations on possible alterations in the mycelium and conidia as affected by the essential oil were performed.

Mycelial discs measuring 9 mm were collected from the plates, inserted in tubes with 1.5mL of Karnovsky's fixative and stored at 4°C. After 24h, each treatment was washed three times for 10min in 0.05M cacodylate buffer solution, transferred to a 1% osmium tetroxide solution for 1h and washed with distilled water three times followed by dehydration in an acetone series (25%, 50%, 70%, 90% and 100%). After dehydration, samples were submitted to the critical point dryer (Balzers CPD 030) to replace acetone by CO<sub>2</sub>.

Specimens were placed on stubs covered with aluminum paper and carbon double-sided tape. Gold coating was done using a sputter coater (Balzers SCD 0.50) for observation with a scanning electron microscope LEO EVO 40 (Carl Zeiss AG). The images were recorded at 20kV accelerating voltage and 10mm of working distance.

### **Effect on Mycelial Growth on Rose Petals**

A 5-mm diameter mycelial disk of *B. cinerea* was placed in the center of a detached rose petal. Petals were placed individually into Petri dishes in three replicates. Cotton plugs humidified with 1mL of 1% *D. ambrosioides* essential oil and controls with 1mL of

sterile distilled 3% water-polysorbate. Mycelial radial diameter was measured every 24h up to 144h.

### **Statistical analysis**

All statistical analyzes were done with the R software (R Core Team, 2014). Comparisons among means were performed using Tukey's test at 5% probability.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Essential oil content and chemical composition

The yield and content of essential oil from *D. ambrosioides* inflorescences was  $1.3 \pm 0.56 \text{ mg.g}^{-1}$  and 0.13%, respectively. In this study, the essential oil was extracted exclusively from inflorescences of *D. ambrosioides*. Other authors found essential oil contents of 0.3% in leaves of *D. ambrosioides* (Vieira et al., 2011) or contents varying from 0.3 to 1.8% when the whole aerial part was employed (Navaei & Mirza, 2004; Rondelli et al., 2012). These differences in oil content may be explained by water stress, growing season and stage of development at harvest, which may alter the chemical composition and yield (Morais, 2009).

Inflorescences appear to yield lower amounts of essential oil when compared to seeds and fruits, that contain most of essential oil of the plant (Dembitsky et al., 2008). In fact, observations done in another study indicate that the yield of essential oil is approximately 9X higher in fruits and seeds than in inflorescences (Unpublished data).

The 11 identified chemical constituents represented 98.2% of the essential oil analyzed (Table 2).



**Table 2** - Constituents of the essential oil extracted from inflorescences of *D. ambrosioides* identified by using gas chromatography.

Compound	kovats índex	%*
$\alpha$ -terpinene	1013.58	4.63
o-cymene	1021.62	22.86
Sylvestrene	1025.13	0.30
Allyl hexanoate	1072.64	0.19
Cyclohex-2-enone,4-hydroxy-4-methyl	1120.58	0.99
Ascaridole	1235.62	57.28
<sis-> piperitone epoxide	1254.04	7.36
Carvenone oxide	1264.96	1.01
Thymol	1274.26	0.17
Carvacrol	1292.74	0.18
Iso-ascaridole	1301.20	3.34
<b>Total</b>		<b>98.21</b>

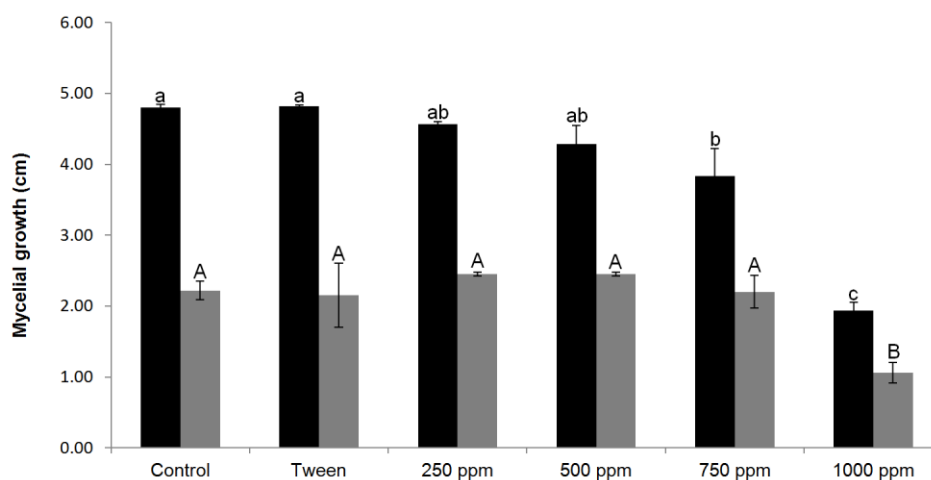
\* Percentage of the compound when using a HP-5 column.

The identity of the essential oil components was similar to those found in the literature, with exception of allyl hexanoate and cyclohex-2-enone,4-hydroxy-4-methyl which were found for the first time in the essential oil extracted from *D. ambrosioides*. The relative amounts of the components in the essential oil differed from the values found by other authors. The major components in inflorescences were ascaridole and O-cymene, corresponding to approximately 80% of the total (Table 2), while the major compounds in leaves were  $\alpha$ -terpinene and O-cymene (Tapondjou, 2002; Singh et al., 2008). Comparatively, the essential oil extracted from inflorescences has more ascaridole than its precursor  $\alpha$ -terpinene and may be more active against plant pathogens. No information is available on essential oil from inflorescences and for this reason a precise quantitative comparison cannot be made.

### Volatile effect on mycelial growth and spore germination

There was a significant inhibition in mycelial growth of *B. cinerea* at 1000ppm (Figure 1). Mycelial growth was inhibited by 59.8% and mycelial growth rate by 52.3% when compared to the control at the highest concentration of essential oil (1000ppm). Higher inhibition was found by Tripathi et al. (2008) who observed 100% of mycelial growth inhibition at 500ppm for *B. cinerea*. One possible reason for the differences may be the sensitivity of the isolates used in the different studies.

Ascaridole, carvacrol and thymol are the only components with activity against *B. cinerea* mentioned in the literature (Jardim et al., 2008; Antunes & Cavaco, 2010). Although the purified components of the essential oil were not tested in this study, they were found in our chemical analyses.

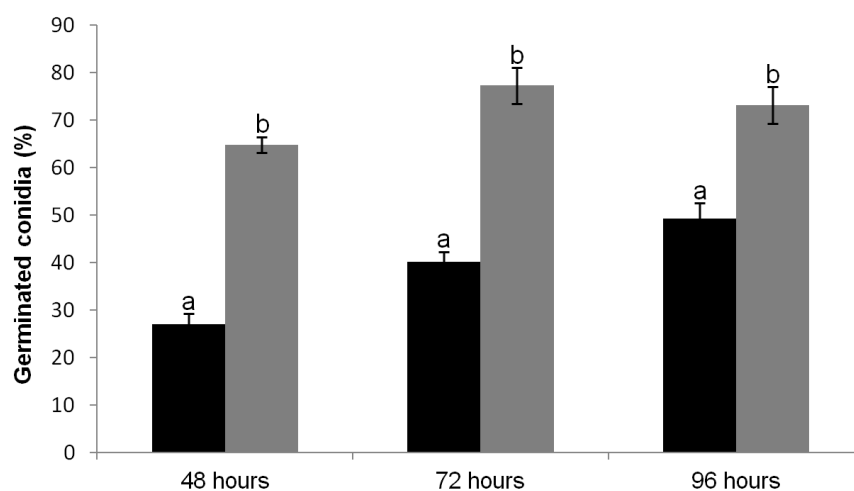


**Figure 1.** Effect of essential oil from inflorescence of *D. ambrosioides* on mycelial growth of *B. cinerea*. Black bars represent mycelial growth up to 72 h and grey bars represent mycelial growth rate (cm/day). Error bars represent standard error. Regression equation for mycelial growth considering the intervals between 0 and 1000ppm was estimated as following  $y = -0.002547x + 5.146667$  ( $R^2 = 78.21$ ).

Spores germination was inhibited by essential oil volatiles up to 96h after the treatment (Figure 2). Germination of spores was

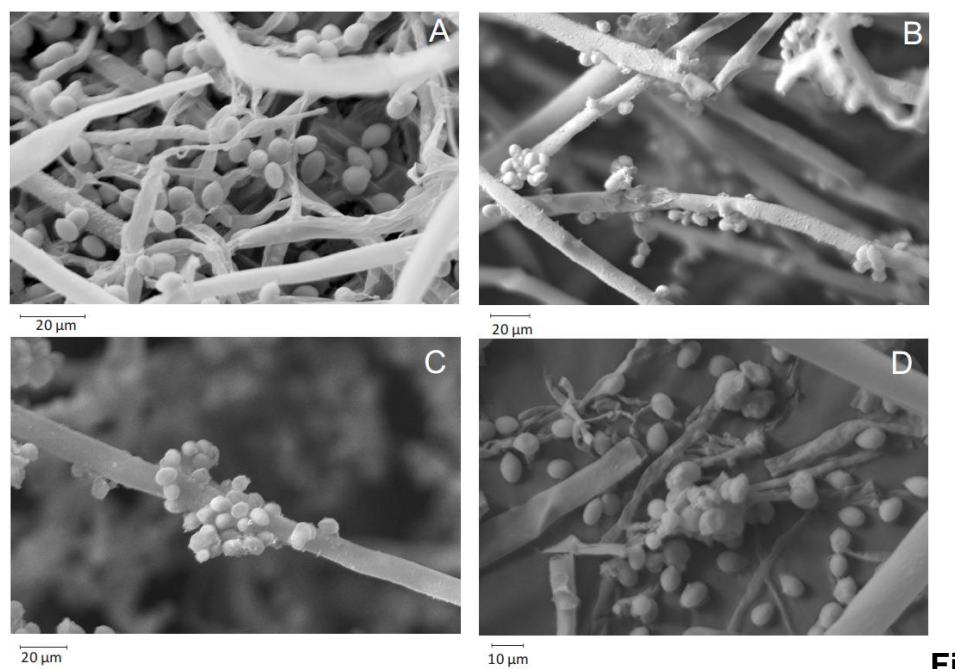
reduced by 58.3, 48.1 and 48.3% at 48, 72 and 96h, respectively, after the application of the essential oil.

No reports on the use of *D. ambrosioides* essential oil on *B. cinerea* spore inhibition was found in the literature. However, the ethanolic extract of this plant was reported to inhibit spore germination by 18% in the closely related species *Botrytis elliptica* (Hsieh et al., 2005).



**Figure 2** - Effect of *D. ambrosioides* essential oil on *B. cinerea* spore germination. Black bars represent treatments and grey bars represent control. Error bars represents the standard error.

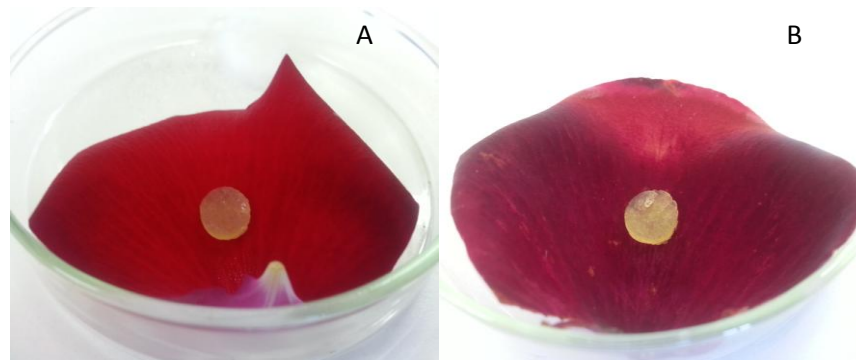
There were no morphological differences between spores or mycelium treated and untreated with essential oil (Figure 3). No other studies were performed with scanning electron microscopy to evaluate the effects of essential oil from *D. ambrosioides* on mycelia and spores of *B. cinerea*.



**Figure 3** – Scanning electron microscopy of the effect of *D. ambrosioides* essential oil on *B. cinerea*. **A** – *B. cinerea* grown in plates containing a cotton plug moistened with 1.6% water-polycarbonate (control); **B** - *B. cinerea* treated with 1% essential oil; **C** - *B. cinerea* with 1.6% water-polycarbonate applied directly on mycelial discs (control); **D** - 1% essential oil applied directly on mycelial discs.

### Essential oil effect on *B. cinerea* mycelial growth on rose petals

There were no significant differences in mycelial growth among the treatments. The mycelial growth rate was  $1.1\text{cm}\cdot\text{day}^{-1}$  (Data not shown). The treatment with essential oil caused a color change in rose petals that could be observed after 24h (Figure 4). The essential oil may have accelerated the senescence of the petals. This metabolic acceleration unfortunately limits the potential use of the essential oil from *D. ambrosioides* to protect roses against *B. cinerea*.



**Figure 4** – Effect of *D. ambrosioides* essential oil on detached rose petals. A - Control without treatment with essential oil; B - Rose petal treated with essential oil.

#### **ACKNOWLEDGMENT**

The first author is grateful to Capes for the study scholarship. We acknowledge Fapemig for the financial support given to the Electron Microscopy and Ultrastructural analysis laboratory (UFLA).

#### **CONFLICT OF INTEREST**

All authors declare that they have no conflict of interest.

\*Versão preliminar

## REFERENCES

Adams RP (2007). "Identification of essential oils components by gas chromatography/ mass spectroscopy". Carol Stream: Allured,469p.

Antunes MDC, Cavaco M (2010). The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 25(5): 351-366.

Ávila-Blanco ME, Rodríguez MG, Duque JLM, Muñoz-Ortega M, Ventura-Jaárez J (2014). Amoebicidal Activity of Essential Oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants in an Amoebic Liver Abscess Hamster Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/930208>

Barbieri RL, Stumpf ERT (2005). Origem, evolução e história das rosas cultivadas. *Revista Brasileira de Agrociência*. 11(3): 267-271.

Bassolé IHN, Juliani HR (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*. 17(4):3989–4006. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules17043989>

Cabral LC, Pinto VF, Patriarca A (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology* 166 (1): 1-14.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026>

Dembitsky V, Shkrob I, Lumir LO (2008). Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. *Biomedical Papers*. 152 (2): 209-215.  
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2008.032>

Dominiak BC, Ekman JH (2013). The rise and demise of control options for fruit fly in Australia. *Crop Protection*. 51 : 57- 67.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.04.006>

Gangopadhyay G, Das S, Mukherjee KK (2002). Speciation in *Chenopodium* in West Bengal, India. *Genetic Resources and Crop Evolution* 49:503-510.

Harkema H, Mensink MGJ, Somhorst DPM, Pedreschi RP, Westra EH (2013). Reduction of *Botrytis cinerea* incidence in cut roses (*Rosa* hybrid L.) during long term transport in dry conditions. *Postharvest Biology and Technology*. 76: 135-138.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.10.003>

Hsieh TF, Huang JH, Hsieh LJ, Hu MF, Ko WH (2005). Antifungal effect of plant extracts on phytopathogenic fungi. *Plant Pathology Bulletin*. 14(1):59-66.

Jardim CM, Jham GN, Dhingra OD, Freire, MM (2008). Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *J Chem Ecol*. 34(9):1213–1218. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-008-9526-z>

Kováts E (1965). Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advances in Chromatography*. 1:229-247.

Lorenzi H, Matos FJA (2002). *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Editora Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 512p.

Liu W, Liu Y, Zhang X, Li N, Cheng H (2013). *In vitro* bactericidal activity of jinghua weikang capsule) and its individual herb *Chenopodium Ambrosioides* L. against antibiotic-resistant *Helicobacter Pylori*. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 19 (1):54-57. <http://dx.doi.org/10.1007/s11655-012-1248-y>



Monzote L, Pastor J, Scull R , Gille L ( 2014). Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Phytomedicine*. 21(8-9):1048–1052. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2014.03.002>

Morais LAS (2009). Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*. 27(2):4050-4063.

Murashige T, Skoog, F (1962). A revised Medium for Rapid Growth and BioAssays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3):473-497. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Navaei MN, Mirza M (2004). Chemical composition of the oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 3(2):88-88.

Nisar M, Shah H, Khan I, Fazal-ur-Rehman, Khan MS, Marwat SK , Niazi ZR, Ullah A (2013). Antimicrobial Potential and Phytochemical Investigation of Fixed Oil of Plant *Chenopodium ambrosioides* Linn. *Asian Journal of Chemistry* 25(2):1069-1072. <http://dx.doi.org/10.14233/ajchem.2013.13439>

Oliveira JA (1991). Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Ortega-Ramirez LA, Rodriguez-Garcia I, Leyva JM, Cruz-Valenzuela MR, Silva-Espinoza BA, Gonzalez-Aguilar GA, Siddiqui W, Ayala-Zavala JF. (2014). Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. *J. Food Sci.* 79(2):129-37. doi: 10.1111/1750-3841.12341.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Rondelli VM, Costa AV, Queiroz VT, Pinheiro PF, Pratisoli D (2012) . Composição Química e Avaliação do Potencial Inseticida do Óleo Essencial de *Chenopodium ambrosioides* no Controle de *Frankliniella schultzei*. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia.* 8(15):2450-2458.

Salifou S, Daga DF, Attindehou S, Deguenon R, Biauou CF (2013). Antiparasitic effects of the water extract from *Chenopodium ambrosioides* L. (*Chenopodiaceae*) against some gastrointestinal nematodes in West African Long Legged goats. 5(2):13-16.

Shao X, Cheng S, Wang H, Yu D, Mungai C (2013). The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*. *Journal of Applied Microbiology*. 114 (6): 1642 -1649. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12193>

Singh HP, Batish DR, Kohli RK, Mittal S, Yadav, S (2008). Chemical Composition of Essential Oil From Leaves of *Chenopodium ambrosioides* from Chandigarh, India. *Chemistry of Natural Compounds*. 44(3):378-379. <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-008-9070-7>

Tapondjou LA, Adler C, Bouda H, Fontem DA (2002). Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. *Journal of Stored Products Research*. 38(4):395–402. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-474x\(01\)00044-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-474x(01)00044-3)

Tripathi P, Dubey NK, Shukla AK (2008). Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 24:39-46.

Tuset JJ (1987). *Pododumbres de los frutos cítricos*. Valencia: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. 206.

Umpiérrez ML, Lagreca ME, Cabrera R, Grille G, Rossini C (2012). Essential oils from Asteraceae as potential biocontrol tools for tomato pests and diseases. *Phytochemistry*. 11(4):339-350. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-012-9253-5>

Van Den Dool H, Kratz DJ (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatography* 11:463-467.

Verma M, Sharma S, Prasad R (2009). Biological alternatives for termite control: A review. 63 (8):959-972. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.05.009>

Vieira DF et al. (2011). Composição química do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. In: Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e Encontro Latino Americano de Pós Graduação, Alegre, Espírito Santo, 15:1-4.

Vita GF, Ferreira I, Pereira MAVC, Azevedo JR, Sanavria A, Barbosa CG, Gallo SSM, Vasconcellos HVG (2014). Eficácia de *Chenopodium ambrosioides* (erva-de-santa-maria) no controle de endoparasitos de *Gallus gallus* (galinha caipira). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 34(1):39-45. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2014000100007>

Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JAL (2007). Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*. 8(5):561-580. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>

Zakba M, Pavela R, Slezakova L (2009). Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. 30(2):250-253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.04.002>