

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO E LICENCIATURA EM QUÍMICA**

**ANA PAULA PALARO KLEIN
JESSICA DE SOUZA**

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS E SECAS, DE
CAPIM-ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees) POR
HIDRODESTILAÇÃO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2012

**ANA PAULA PALARO KLEIN
JESSICA DE SOUZA**

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
FOLHAS FRESCAS E SECAS, DE CAPIM-ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees)
POR HIDRODESTILAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira

Co-orientador: Profa. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

FOLHA DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS E SECAS, DE CAPIM-ANNONI-2 (*Eragrostis plana* Nees) POR HIDRODESTILAÇÃO** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° **049B2** de 2012.

Fizeram parte da banca os professores.

Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira

Profa. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Profa. Dra. Marlene Capelin Ignoato

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus por estar ao nosso lado sempre e nos ajudar principalmente nos momentos em que tudo parecia dar errado.

Aos nossos pais que muitas vezes abriram mão do que precisavam para investirem nos nossos estudos.

Aos nossos noivos pelo carinho, companheirismo e compreensão.

À Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira pela orientação, dedicação, incentivo, paciência e por todos os conhecimentos transmitidos.

À Profa. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni pela co-orientação, conhecimentos transmitidos, atenção e paciência.

Ao Prof. Dr. Ricardo Freitas Branco pela colaboração e os conhecimentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite de contribuir com o enriquecimento deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

KLEIN, Ana Paula Palaro; SOUZA, Jessica de. Otimização do processo de obtenção do óleo essencial de folhas frescas e secas, de capim-annoni-2 (*eragrostis plana* nees) por hidrodestilação.35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR. Pato Branco, 2012.

Os óleos essenciais são substâncias voláteis, geralmente uma mistura complexa de hidrocarbonetos, terpenos, álcoois e compostos carbonílicos, que vem sendo estudados ao longo dos últimos anos com o objetivo de identificar novas substâncias químicas e aplicá-las na indústria. No processo de obtenção de óleos essenciais o método considerado como o de maior aplicação e viabilidade econômica é o de hidrodestilação. O *Eragrostis Plana* Nees é uma *Poaceae* tropical, perene, estival, com atributos de planta invasora introduzida acidentalmente no Brasil. O objetivo desse trabalho foi otimizar o processo de extração de óleo essencial de folhas frescas e secas de *Eragrostis Plana* Nees, via hidrodestilação e avaliar sua composição química. O material vegetal (folhas) foi coletado na Estação Experimental da UTFPR – *Câmpus* Pato Branco. As folhas foram secas a temperatura ambiente por períodos de tempo diferentes. Fez-se um planejamento fatorial 2^4 dos experimentos propostos, levando em consideração 4 variáveis (tempo de secagem, quantidade de biomassa, tempo de extração e tamanho de biomassa). As amostras foram submetidas a hidrodestilação com aparelho de Clevenger, sendo o hidrolato centrifugado e o óleo essencial obtido analisado por CG/EM. Verificou-se que o tempo de secagem foi a única variável significativa do processo, sendo que, com 24h de secagem, obtém-se o melhor rendimento em óleo essencial. Com relação a composição do óleo, observou-se que os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *Eragrostis plana* Nees foram: 2-6-di-terc-butil – hidróxi-4-metil-benzeno (15,50%), 1,6,7,8-tetrahydro-1,6-dimetil-4-oxo - 4H-pirido [1,2-a] - pirimidina-3-carboxamida (16,02%) e 2,4-bis-(terc-butil)-6-metil – fenol (16,75%).

Palavras-chave: Capim Annoni-2, cromatografia, identificação.

ABSTRACTS

KLEIN, Ana Paula Palaro; SOUZA, Jessica de. Optimization of the process of obtaining the essential oil of fresh leaves and dried Capimannoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) by hydrodistillation.35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR. Pato Branco, 2012.

Essential oils are volatile substances, usually a complex mixture of hydrocarbons, terpenes, alcohols and carbonyl compounds, which has been studied over the last years with the aim of identifying new chemicals and apply them in industry. In the process of obtaining essential oils regarded as the method of application and greater economic feasibility is hydrodistillation. The *Eragrostis Plana* Nees is a poaceae, tropical, perennial, summer, with attributes of invasive plant accidentally introduced in Brazil. The objective of the study was to optimize the extraction process of essential oil of fresh and dried leaves of *Eragrostis Plana* Nees, via hydrodistillation and evaluate its chemical composition. The plant material (leaves) was collected at the Experimental Station of UTFPR - Campus Pato Branco. The sheets were dried at room temperature for different time periods. There was a 2⁴ factorial design of experiments proposed, taking into account four variables (drying time, amount of biomass, extraction time and size of biomass), the samples were subjected to hydrodistillation with a Clevenger apparatus, being centrifuged and the hydrodistilled essential oil obtained analyzed by GC/MS. It was found that the drying time was the only significant variable in the process, and, after 24 hours of drying, obtain the best yield of essential oil. Regarding the composition of the oil showed that the main compounds found in the essential oil of *Eragrostis plana* Nees were: 2-6-di-terc-butyl – hidróxi-4-metil-benzeno (15,50%), 1,6,7,8-tetrahidro-1,6-dimetil-4-oxo - 4H-pirido [1,2-a] - pirimidina-3-carboxamida (16,02%) and 2,4-bis-(terc-butil)-6-metil – fenol (16,75%).

Keywords: Capim Annoni-2, chromatography, identification

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura Química do Limoleno.....	13
Figura 2 - Capim Annoni- 2.	15
Figura 3 - Secagem do Capim Annoni-2.	23
Figura 4 – Volume (mL) de Hidrolato obtido.....	24
Figura 5 - Sistema de Extração Clevenger.....	25
Figura 6 - Resultado do planejamento fatorial feito para o Capim Annoni-2	27
Figura 7 – Cromatograma 1 do óleo essencial de <i>Eragrostis plana</i> Nees.....	29
Figura 8 – Cromatograma 2 do óleo essencial de <i>Eragrostis plana</i> Nees.....	29
Figura 9 – Cromatograma 3 do óleo essencial de <i>Eragrostis plana</i> Nees.....	29
Figura 10 - Espectro de massas e estrutura química da 1,6,7,8-tetrahydro-1,6-dimethyl-4-oxo - 4H-pirido [1,2-a] - pirimidina-3-carboxamida	31
Figura 11 - Espectro de massas e estrutura química do 2,4-bis-(terc-butil)-6-metil – fenol	31
Figura 12 - Espectro de massas e estrutura química do 2-6-di-terc-butil-hidróxi-4-metil-benzeno	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis analisadas no planejamento fatorial e seus respectivos níveis.	24
Tabela 2 – Rendimento em volume das extrações de óleo essencial das folhas de Capim Annoni-2, realizadas de acordo com planejamento fatorial prévio.	26
Tabela 3 - Dados estatísticos obtidos com base nos experimentos propostos pelo planejamento fatorial 2^4	27
Tabela 4 - Compostos identificados no óleo essencial de <i>Eragrostis plana</i> Nees com seus respectivos tempos de retenção e abundâncias.	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1 EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	12
3.2 CARACTERÍSTICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	12
3.4 <i>ERAGROSTIS PLANA</i> NEES	15
3.4.1 Importância Econômica	17
3.4.2 Biologia.....	17
3.5 PLANEJAMENTO FATORIAL	18
3.6 CROMATOGRAFIA.....	20
3.6.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	23
4.2 SECAGEM	23
4.3 PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ⁴	23
4.4. HIDRODESTILAÇÃO	24
4.5 CENTRIFUGAÇÃO	25
4.6 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	26
5.2 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL.....	28
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32

1 INTRODUÇÃO

Há milhares de anos, os óleos essenciais vêm sendo obtidos de plantas e utilizados em diferentes processos tecnológicos, principalmente nas indústrias de cosméticos, fármacos e alimentos. Uma das principais regiões de matas nativas exploradas é a região da floresta Amazônica (SANTOS *et al*, 2004).

Os óleos essenciais são frações voláteis naturais (SANTOS *et al*, 2004), classificados como metabólitos secundários produzidos pelas plantas e com funções variadas (PACHECO *et al*, 2008). A grande maioria dos óleos essenciais de interesse comercial é uma mistura de hidrocarbonetos, monoterpenos e sesquiterpenos. Um segundo componente presente em concentração elevada consiste principalmente de compostos aromáticos (ARAÚJO, 2008).

Nos últimos anos, estudos científicos têm sido conduzidos com o objetivo de identificar as substâncias químicas que compõem os óleos essenciais de plantas da Amazônia brasileira (SANTOS *et al*, 2004; COSTA *et al*, 2008; LIMA *et al*, 2009; SIQUEIRA *et al*, 2010; PINHEIRO *et al*, 2011).

No processo de obtenção de óleos essenciais podem ser aplicados diversos métodos, como a hidrodestilação, arraste a vapor, *headspace*, maceração, extração por solvente, etc. Dentre esses, o método considerado como de maior aplicação e melhor viabilidade econômica é o de hidrodestilação (SANTOS *et al*, 2004).

O capim-annoni-2 possui atributos de planta invasora, é rejeitado pelos animais, cresce rapidamente e tem longa fase reprodutiva (FERREIRA *et al*, 2008a). Outra característica que torna essa planta muito eficiente na competição com outras espécies é a liberação de substâncias químicas no solo, que afetam a vegetação nas proximidades, atuando como herbicida, impedindo a germinação e crescimento de outras espécies, conhecido como efeito alelopático (RUSCONI, 2007).

Dentro desse contexto, este trabalho estará apresentando a otimização do processo de obtenção do óleo essencial de *Eragrostis plana* Nees, utilizando-se de um planejamento experimental e tratamento estatístico dos dados obtidos. Relata também a análise do óleo essencial obtido, identificando os componentes detectados. É importante ressaltar que não encontrou-se na literatura trabalhos dessa natureza com óleo essencial de capimannoni-2.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar o processo de obtenção de óleo essencial de folhas frescas e secas de capim annoni-2, via hidrodestilação, e avaliar sua composição química.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um planejamento fatorial, considerando tempo de extração, tamanho das folhas, tempo de secagem e quantidade de biomassa, que podem acarretar em diferentes rendimentos;
- Obter o óleo essencial pelo processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger;
- Analisar algumas amostras do óleo essencial obtido, a fim de identificar a composição química de amostras de folhas frescas e secas de capim annoni-2.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais de plantas são encontrados nas partes aéreas (folhas e ramos finos), cascas, troncos, raízes, frutos, flores, sementes e resinas (SANTOS *et al*, 2004). A extração pode ser realizada mecanicamente ou por procedimentos de destilação. Como diversos constituintes são termolábeis, sensíveis a ácidos ou facilmente hidrolisados, a composição e a qualidade do produto dependem do procedimento de isolamento (ARAÚJO, 2008).

A técnica de hidrodestilação baseia-se no aquecimento do material vegetal em água, fazendo com que os produtos voláteis sejam arrastados juntamente com o vapor d'água por um sistema tipo Clevenger. Normalmente após 4 horas de extração, o óleo é obtido. Se este for visível, seu volume é medido e coletado em frasco para posterior análise de seus compostos. Se o óleo não for visível, ou seja, caso permaneça parcialmente miscível em água, coleta-se o material e procede-se a extração com uso de funil de separação com éter etílico (PACHECO *et al*, 2008).

Os componentes individuais podem ser separados do extrato bruto por meio da destilação fracionada à pressão reduzida, cristalização ou cromatografia. A pressão e a temperatura, utilizadas no processo, são selecionadas de forma a evitar, ao máximo perdas de substâncias aromáticas provocadas pela decomposição térmica, oxidação ou hidrólise (ARAÚJO, 2008).

3.2 CARACTERÍSTICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais não apresentam nenhuma relação com os óleos comestíveis, uma vez que não são ésteres de glicerol. São inflamáveis e solúveis em álcool e éter, mas insolúveis em água. A sua utilização na indústria de processamento de alimentos continua crescendo, em substituição aos condimentos na forma natural, em virtude da sua uniformidade, estabilidade e higiene (ARAÚJO, 2008).

As reações químicas e bioquímicas responsáveis pelas características do aroma no alimento são muito complexas. Existem aproximadamente 4.000 tipos de substâncias voláteis já identificadas oriundas de diferentes vias metabólicas, das

quais apenas algumas são conhecidas. Além do mais, a relação entre a estrutura química e a atividade desses compostos permanece, em sua grande maioria, ainda desconhecida (ARAÚJO, 2008).

Os óleos essenciais são geralmente uma mistura complexa de hidrocarbonetos, álcoois e compostos carbonílicos. Os hidrocarbonetos mais frequentes encontrados pertencem a grupos de substâncias conhecidas como monoterpenos e, em menor frequência, sesquiterpenos (ARAÚJO, 2008), ambos, pertencentes ao metabolismo secundário das plantas (MORAIS, 2009).

O metabolismo secundário, por sua vez, pode ser influenciado, dentre outros, por fatores genéticos e climáticos (temperatura, intensidade de luz, efeito sazonal, etc.) (MORAIS, 2009). Os óleos essenciais, na maioria das vezes, apresentam um aumento em seu teor quando as plantas produtoras se encontram em ambientes com temperatura elevada, porém, em dias muito quentes, pode-se observar perda excessiva dos mesmos (MORAIS, 2009).

A composição química e o teor de óleo essencial podem sofrer alterações durante as estações do ano, assim como o horário de coleta das plantas também é um aspecto relevante na produção de óleos essenciais, pois, ao longo do dia, pode-se observar que o aroma característico de cada planta torna-se mais acentuado, sendo possível acreditar que a concentração de óleos essenciais seja maior naquele período, ou que esteja ocorrendo alteração na proporção relativa entre os componentes deste mesmo óleo essencial (MORAIS, 2009).

O nome terpeno deu-se devido a terebintina, um líquido rico em monoterpeno obtido a partir da resina de vários *Pinus spp* (THORMAR, 2011). Os terpenos tem a fórmula geral $(C_5H_8)_n$, possuem grupos funcionais como hidroxila (OH) ou carbonila (C=O) e geralmente são hidrocarbonetos insaturados de estrutura cíclica. Estes são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno, que variam de 2 a 8: os monoterpenos, ou simplesmente terpenos (Figura 1), possuem duas unidades de isoprenos com dez carbonos; os sesquiterpenos, três unidades; e os diterpenos, quatro unidades. Ocorrem também os triterpenos (30 átomos de carbono), entre outros (ARAÚJO, 2008).

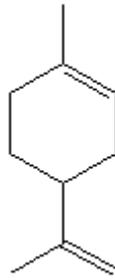


Figura 1 - Limoneno

3.3 APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS

O século XIX é considerado o início da fase moderna de aplicação industrial de óleos essenciais. No entanto, seu uso em larga escala remonta ao Egito antigo (BASER, 2010).

A principal razão para a expansão da indústria de óleos essenciais e a crescente demanda por produtos foi o desenvolvimento das indústrias de alimentos, sabão e cosméticos. Empresas multinacionais de hoje, as principais usuárias das fragrâncias e sabores, evoluíram diretamente do desenvolvimento dos óleos, em meados do século XIX (BASER, 2010).

O desenvolvimento da indústria de refrigerantes é de grande importância por ser um grande consumidor de óleos essenciais, especialmente os de origem cítrica. Hoje em dia, apenas bebidas produzidas pela Coca-Cola, são consumidas em todo o mundo em quantidade superior a 1 bilhão de unidades por dia. Se considerarmos que o teor médio de óleo essenciais em uma unidade é de cerca de 0,001-0,002% e, a quantidade padrão de consumo é cerca de 0,31 (300g), então o consumo diário de óleos essenciais, apenas por esta empresa é de 3 a 6 toneladas por dia (BASER, 2010).

Pode-se estimar que o mercado mundial dos aromas e fragrâncias corresponde a um valor de 10-12 bilhões de euros, sendo igualmente partilhada por cada grupo de produtos (alimentos, cosméticos, domissanitários, entre outros). É muito difícil estimar quanto se usa de óleos essenciais em cada um dos grupos. Contudo, sabe-se que os óleos são mais usados em sabores do que em fragrâncias, pois as fragrâncias utilizadas atualmente correspondem aos aromas artificiais, especialmente quando se trata de compostos de grande volume, como produtos domésticos (BASER, 2010).

Os óleos picantes são amplamente utilizados em vários salgadinhos industrializados, que são geralmente consumidos com refrigerantes. Além disso, a indústria de bebidas alcoólicas é um usuário substancial de óleos essenciais, usa-se anis na região do Mediterrâneo; óleos vegetais em licores; gengibre em cerveja de gengibre, hortelã-pimenta em licor de menta, entre outros (BASER, 2010).

Os óleos essenciais são usados também para a fabricação de doces, laticínios, sobremesas, produtos de confeitaria (fresco e em pó), manufatura de cremes, entre outros, sendo que os principais óleos são os de frutas cítricas, canela, cravo, gengibre e anis (BASER, 2010).

É importante ressaltar que uma grande variedade de óleos essenciais são usados na medicina "natural" para o tratamento de doenças, utilizando-se uma técnica chamada aromaterapia, onde os óleos essenciais são usados como ingredientes bioativos (BASER, 2010).

3.4 *Eragrostis plana* Nees

O *Eragrostis plana* Nees (Figura 2) é vulgarmente conhecido como Capim-Annoni 2, Capim-Chorão e Capim-Teff (KISSMANN, 1991).



Figura 2 - Capim Annoni- 2.

Fonte: Rusconi, 2007

O capim-annoni-2 é uma *Poaceae* tropical, perene, estival, exótica, com origem na África, introduzida acidentalmente no Brasil como contaminante de sementes importadas, na década de 1950 (FEREIRA *et al*, 2008a).

A *Poaceae* é uma família de gramíneas (monocotiledôneas) que contém o gênero *Cymbopogon*, a partir do qual óleos de *lemongrass*, citronela e palmarosa são derivados. Os principais componentes da *lemongrass* são neral e geranial, que são conhecidas como citral, e os principais componentes do palmarosa são o acetato de geraniol e geranil (THORMAR, 2011).

As primeiras observações sobre esta espécie foram feitas na Estação Experimental Zootécnica de Tupanciretã e na fazenda de Sr. Ernesto José Annoni, em Sarandí, RS (KISSMANN, 1991).

Nessa época os campos nativos, especialmente do planalto médio do Rio Grande do Sul (RS), estavam sendo tomados pela “Barba-de-Bode” – *Aristida* spp, que reduzia enormemente o valor das pastagens. Não havia solução viável para impedir a progressão dessa planta invasora (KISSMANN, 1991).

Eragrostis plana foi considerada uma alternativa interessante, pois mostrou-se capaz de competir e sobrepujar a “Barba-de-Bode”. Passou-se então a distribuir sementes de “Capim-Annoni-2” na região, inclusive nos estados de Santa Catarina e Paraná (KISSMANN, 1991).

Contudo, logo se verificou o caráter agressivo dessa espécie, como invasora, bem como a baixa qualidade como pasto. Sua comercialização foi proibida, bem como seu transporte e importação de sementes e mudas, pela Portaria nº 205, de 13/03/79, do Ministério da Agricultura (KISSMANN, 1991).

Uma das estratégias utilizadas pelas plantas invasoras para competir e dominar em comunidades vegetais é a liberação de aleloquímicos, produtos do metabolismo secundário, tendo como matérias-primas substâncias originadas no metabolismo primário. A alelopatia é o efeito de uma planta sobre outra, através da liberação de substâncias no ambiente que apresentam ação direta ou indireta sobre espécies vizinhas, incluindo-se interações intra e inter-plantas e micro-organismos, podendo haver domínio de uma espécie sobre outra que apresenta susceptibilidade no ambiente compartilhado (FERREIRA *ET AL*, 2008a).

Segundo Ferreira *et al* (2008a), essas substâncias encontram-se em todas as partes da planta, principalmente nas raízes e folhas, e são liberadas no ambiente por emanações voláteis ou compostos solúveis em água.

Para os pesquisadores, supõe-se que seus efeitos alelopáticos prejudiquem a germinação de sementes de diversas espécies nativas e exóticas, fato que pode estar contribuindo para a expansão do “Capim-Annoni-2” sobre os campos nativos no Rio Grande do Sul (FERREIRA *et al*, 2008a).

Estimou-se que a área invadida no RS, corresponda a um milhão de ha, o que acarreta em expressivos prejuízos ambientais, econômicos e sociais ao Estado (FERREIRA *ET AL*, 2008a).

3.4.1 Importância Econômica

A planta tem algum valor forrageiro quando nova, cerca de dois meses após a brotação as folhas ficam mais duras e o gado só as consome quando não encontra outra alternativa. É muito rústica, suportando bem o pisoteio. Desenvolve-se bem em solos pobres e ácidos, e nessas condições pode ser uma opção interessante para o pecuarista, pois permite uma lotação maior do que outras gramíneas. A agressividade e rusticidade são consideradas qualidades positivas em áreas de terra fraca (KISSMANN, 1991).

Por outro lado, com sua grande capacidade de disseminação e sua rusticidade, tende a dominar nas áreas onde ocorre. Onde existem condições para um bom desenvolvimento de forrageiras mais nobres, o Capim-Annoni-2 é indesejável, pois acaba nivelando por baixo a capacidade nutritiva do pasto. Com sua enorme capacidade de disseminação e pela dificuldade de sua eliminação, esse capim deve ser considerado como infestante. Não sendo possível delimitar as áreas onde sua presença é benéfica, é sugerida uma campanha permanente de eliminação (KISSMANN, 1991).

3.4.2 Biologia

A semente é pequena, (0,14 X 0,06 X 0,04 cm), de coloração vermelho-alaranjado, com peso médio de mil sementes 0,21g, e considerada como componente do banco de sementes do solo persistente, permanecendo viável neste por mais de cinco anos (FERREIRA *ET AL*, 2008b)

O período de floração e semeadura é muito longo (Outubro a Abril), sendo suas sementes pequenas, facilita-se a propagação através de diversos meios:

correntes de vento, água, aderidas ao corpo de animais ou suas fezes, sendo o homem o meio mais importante. O homem a dispersa como contaminante de lotes de sementes ou diretamente ligados a veículos e/ou máquinas (RUSCONI, 2007).

Menciona-se que uma planta desenvolvida pode produzir até 500.000 sementes, que conservam o poder germinativo por vários anos, no solo (KISSMANN, 1991). As raízes são abundantes, fortes e profundas, sendo altamente resistentes a tração mecânica. Devido ao seu alto teor de fibras, tem digestibilidade muito baixa, o que a torna uma grama intragável para os animais e é geralmente rejeitada, exceto sob condições extremas, onde o gado come as pontas das folhas mais novas, aumentando sua dispersão por causa das sementes em seus pêlos, patas e fezes (RUSCONI, 2007).

Seu uso continuado - que ocorre em áreas onde a maioria das plantas forrageiras desapareceram - tornando-se quase o único membro da dieta, leva a desgaste dentário rápido (RUSCONI, 2007).

3.5 PLANEJAMENTO FATORIAL

Atualmente a possibilidade de obtenção de uma grande quantidade de dados numéricos tem crescido em todos os campos da ciência, incluindo a química analítica, devido ao desenvolvimento de novas técnicas e instrumentação que permitem uma resposta de forma mais rápida. Neste contexto, a aplicação de ferramentas estatísticas é de fundamental importância, principalmente para explorar e entender uma gama crescente de dados e informações originadas de um sistema (ARRUDA, 2002)

É comum, especialmente em indústrias químicas, aparecerem problemas em que precisamos estudar várias propriedades ao mesmo tempo e estas, por sua vez, são afetadas por um grande número de fatores experimentais (NETO *et al*, 2010).

Usando planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, os pesquisadores podem extrair do sistema em estudo, o máximo de informações úteis, fazendo um número mínimo de experimentos. Além disso, pode-se fabricar produtos com melhores características, diminuir seu tempo de desenvolvimento, aumentar a produtividade de processos, minimizar a sensibilidade dos produtos às variações nas condições ambientais, e assim por diante (NETO *et al*, 2010).

Planejar experimentos é definir uma sequência de coletas de dados experimentais para atingir certos objetivos. Dentre os métodos de planejamento experimental disponíveis na literatura, o planejamento fatorial é o mais indicado quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, sendo que em cada tentativa ou réplica, todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável são investigadas (CUNICO, 2008).

Este tipo de planejamento normalmente é representado por b^k , sendo que k representa o número de fatores e “ b ” o número de níveis escolhidos (CUNICO, 2008).

A atividade estatística mais importante não é a análise de dados, e sim o planejamento dos experimentos em que esses dados devem ser obtidos. A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de oferecer exatamente o tipo de informações que procuramos (NETO *et al*, 2010).

Um dos problemas mais comuns para quem faz experimentos é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre outra variável de interesse. No planejamento de qualquer experimento, a primeira coisa que devemos fazer é decidir quais são os fatores e as respostas de interesse (NETO *et al*, 2010).

Os fatores, em geral, são as variáveis que o experimentador tem condições de controlar, podendo ser qualitativos ou quantitativos. As respostas são as variáveis de saída, nas quais estamos interessados, e que serão – ou não – afetadas por modificações nos fatores. Também podem ser qualitativas ou quantitativas. Dependendo do problema, podemos ter várias respostas de interesse, que talvez precisem ser consideradas simultaneamente (NETO *et al*, 2010).

Dentre as diversas vantagens da utilização do planejamento fatorial, destacam-se as seguintes (CUNICO, 2008):

- redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação;
- estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos;
- determinação da confiabilidade dos resultados;
- realização da pesquisa em etapas, num processo iterativo de acréscimo de novos ensaios;
- seleção das variáveis que influenciam um processo com número reduzido de ensaios;
- representação do processo estudado através de expressões matemáticas;

- elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos.

3.6 CROMATOGRAFIA

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação de espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (COLLINS *et al*, 2006).

Cromatografia é um método físico-químico de separação e está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (DEGANI, 1998)

Os termos e expressões “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” são atribuídos ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett, que, em 1906, os utilizou em dois trabalhos que descrevem suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas. O nome deriva da palavra grega *chrom* (cor) e *grafe* (escrever), embora ele tenha explicitado que o processo não dependa da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados (COLLINS *et al*, 2006).

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade). Para que o acoplamento seja possível, idealmente, é necessário que as características de cada instrumento não sejam afetadas pela sua conexão, assim como não devem ocorrer modificações químicas não controladas do analito e perda de amostra durante a sua passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas (CHIARADIA, 2008).

3.6.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

A cromatografia gasosa é uma técnica com um poder de resolução excelente, tornando possível, muitas vezes, a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra. A técnica baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária e uma fase móvel (COLLINS et al, 2006). A cromatografia gasosa em seu início foi dividida em duas categorias principais: cromatografia gás líquido (CGL) e cromatografia gás-sólido (CGS) (NETO e NUNES, 2003).

A cromatografia gás-sólido foi descrita em 1941, por Hesse e colaboradores, que separaram dois ácidos graxos, no vapor a 100 °C, arrastando-os sobre sílica com um gás, dióxido de carbono, enquanto Cremer e Prior foram os primeiros a descrever um cromatógrafo a gás completo (COLLINS et al, 2006). A CGS emprega um sólido com grande área superficial como fase estacionária (NETO e NUNES, 2003).

A cromatografia gás-líquido foi relatada por Martin e James em 1952, e o uso de um detector por condutividade térmica, por Ray, em 1954. Em 1958 com a ampliação dos poderes analíticos a cromatografia gasosa tornou-se o método analítico de separação e determinação mais usado no mundo (COLLINS et al, 2006). Na CGL ocorre a partição de uma amostra entre uma fase gasosa móvel e uma camada delgada de líquido não volátil que recobre um suporte inerte (NETO e NUNES, 2003).

Como a grande maioria das aplicações atuais é de CGL, essa terminologia foi abandonada, empregando-se, apenas, cromatografia gasosa (CG) (NETO e NUNES, 2003).

A combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas (CG-EM) é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas (CHIARADIA, 2008). A cromatografia separa os componentes de uma mistura, enquanto o espectrômetro de massas fornece a informação sobre cada um deles (SOLOMONS e FRYHLE, 2009).

A espectrometria de massas (EM) envolve a formação de íons em um espectrômetro de massas seguida pela separação e detecção de íons de acordo com a massa e a carga. Um espectro de massas é um gráfico que representa no

eixo x as massas moleculares dos íons detectados, e no eixo y , a abundância de cada íon detectado. O eixo x é rotulado m/z , onde m = massa e z = carga. O pico mais alto é chamado de pico base (SOLOMONS e FRYHLE, 2009).

Os espectrômetros de massas são muito úteis na análise de compostos cujos espectros de massas são conhecidos e na análise de compostos de estruturas completamente desconhecidas. No caso dos compostos conhecidos, uma busca computadorizada compara o espectro de massas do composto em questão com uma biblioteca de espectros de massas (SILVERSTEIN *et al*, 2007)

A CG-EM é aplicável a compostos voláteis e termicamente estáveis nas temperaturas relativamente elevadas empregadas durante o processo de separação cromatográfica (CHIARADIA, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

O material vegetal (folhas) foi coletado na Estação Experimental da UTFPR – *Câmpus* Pato Branco e levado para o laboratório, de forma que a primeira hidrodestilação realizada ocorresse após 24 horas a contar do horário da coleta em campo. Sua exsicata, após identificação, realizada pela Prof^a. Ilsi Iob Boldrini foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências – PPG Botânica, sob o número ICN nº 174417.

4.2 SECAGEM

Após a coleta, o material botânico da espécie em estudo foi seco em temperatura ambiente, como mostra a figura 3, por períodos de tempo diferentes: 24, 48 e 72 horas.



**Figura 3 - Secagem do Capim Annoni-2.
Fonte: Próprio autor**

4.3 PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁴

Antes de se realizar a extração do óleo essencial da planta fez-se um planejamento fatorial 2⁴ dos experimentos propostos, levando em consideração 4

variáveis (Tabela 1): quantidade de biomassa (g), tempo de extração (h), tamanho da biomassa e tempo de secagem (h).

Tabela 1 - Variáveis analisadas no planejamento fatorial e seus respectivos níveis.

Variáveis	(-)	(0)	(+)
1 – Tempo de secagem (h)	24	48	72
2 – Biomassa (g)	20	40	60
3 – Tamanho da biomassa	Pequeno	Médio	Inteiro
4 – Tempo de extração (h)	2	3	4

4.4. HIDRODESTILAÇÃO

Cada amostra foi submetida à hidrodestilação, no laboratório de Química da UTFPR – *Câmpus* Pato Branco, utilizando-se um aparelho de Clevenger (Figura 5) , conforme previsto a partir do planejamento fatorial. As amostras do óleo essencial e água (hidrolato), assim obtidas (Figura 4), foram armazenadas em frascos, sob refrigeração.



Figura 4 – Volume (mL) de Hidrolato obtido
Fonte: Próprio autor



Figura 5 - Sistema de Extração Cleverger
Fonte: Próprio autor

4.5 CENTRIFUGAÇÃO

Em função da dificuldade em observar e medir o volume de óleo essencial obtido, as amostras de hidrolato foram centrifugadas em centrífuga Fanem Excelsa Baby I, modelo 206, número FP 6407, KW 0,440, por 10 min para que o óleo essencial fosse separado por diferença de densidade. Em seguida o óleo essencial foi coletado com o auxílio de uma micro pipeta Varin P/N HN 80665 7105 NR 100 μ L SYR e armazenado em *vial*, sob refrigeração até serem submetidos à análise.

4.6 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial obtido foi analisado por CG/EM, nas seguintes condições: coluna VA-5 (30mx0,25mmx0,25 μ m), temperatura de injeção 250 °C, rampa de aquecimento 60 °C – 3 °C/min -240 °C, gás hélio, fluxo de 1 mL/min.

A identificação dos constituintes foi realizada com base nos índices de retenção (Adams 2007, Van del Dol e Kratz, 1964), calculados a partir da co-injeção de uma mistura de *n*-alcanos e por comparação dos seus espectros de massas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Após a elaboração do planejamento experimental e realização dos ensaios, os resultados de rendimento em volume, do óleo obtido são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Rendimento em volume das extrações de óleo essencial das folhas de Capim Annoni-2, realizadas de acordo com planejamento fatorial prévio.

Extração	Tempo de secagem (h)	Biomassa (g)	Sup. De contato	Tempo de extração (h)	Volume final (µL)
1	24	20	Inteiro	4	230
2	24	60	Inteiro	4	275
3	24	60	pequeno	4	236
4	24	20	pequeno	4	199
5	24	20	Inteiro	2	165
6	24	60	pequeno	2	235
7	24	60	Inteiro	2	487
8	24	20	pequeno	2	267
9	48	40	Médio	3	274
10	48	40	Médio	3	75
11	48	40	Médio	3	152
12	72	20	pequeno	4	100
13	72	60	Inteiro	4	173
14	72	60	Pequeno	4	161
15	72	20	Inteiro	4	190
16	72	20	Pequeno	2	195
17	72	60	Inteiro	2	165
18	72	60	Pequeno	2	130
19	72	20	Inteiro	2	140

Verifica-se, com base na tabela 2, que o maior rendimento em volume de óleo foi obtido no ensaio 7, no qual utilizou-se menor tempo de secagem das folhas, maior quantidade de biomassa e tamanho de partícula.

A partir dos resultados obtidos foi possível realizar um tratamento estatístico dos ensaios, buscando identificar quais das variáveis exerceram maior influência no rendimento de óleo essencial. Na tabela 3 observam-se os dados resultantes do tratamento estatístico dos experimentos.

Tabela 3 - Dados estatísticos obtidos com base nos experimentos propostos pelo planejamento fatorial 2^4 .

Fator	Efeito	Erro	t student	P
Média	202,579	19,64749	10,31068	0,000007
Var. 1	-105,000	42,82071	-2,45208	0,039807
Var. 2	47,000	42,82071	1,09760	0,304314
Var. 3	37,750	42,82071	0,88158	0,413711
Var. 4	-27,500	42,82071	-0,64221	0,538699
1/2	-46,000	42,82071	-1,07425	0,314042
1/3	-17,250	42,82071	-0,40284	0,697615
1/4	26,000	42,82071	0,60718	0,560564
2/3	46,750	42,82071	1,09176	0,306723
2/4	-15,500	42,82071	-0,36197	0,726746
3/4	5,250	42,82071	0,12260	0,905445

Os dados estatísticos apresentados na tabela 3 possibilitaram a elaboração do gráfico de Pareto (Figura 6), onde pode-se observar o resultado do planejamento fatorial.

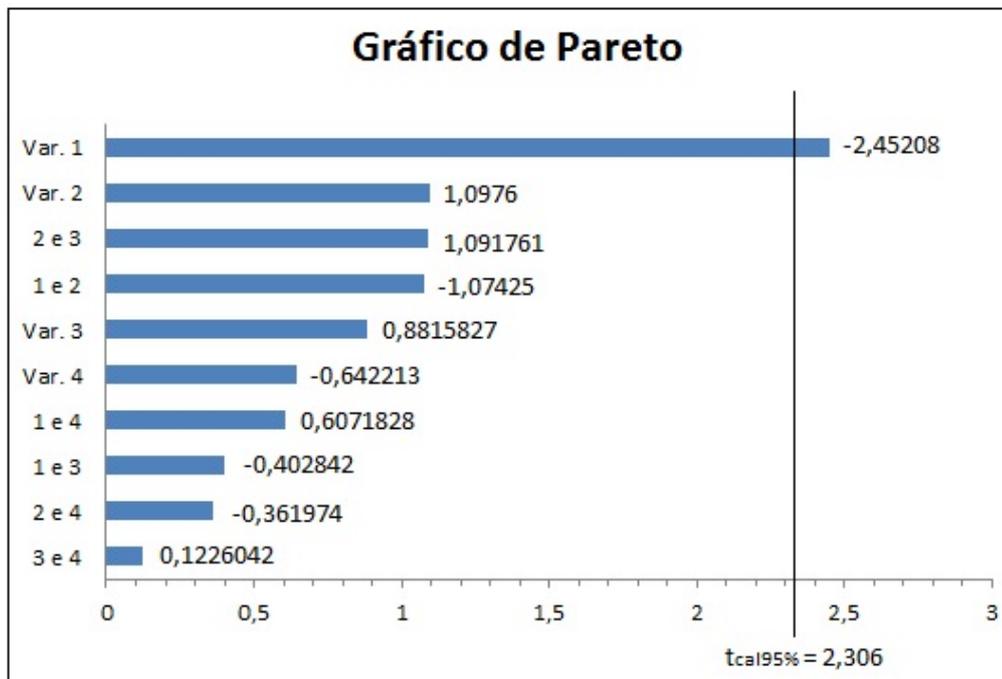


Figura 6 - Resultado do planejamento fatorial feito para o Capim Annoni-2

Por meio do gráfico de Pareto observou-se que apenas o tempo de secagem (variável 1) foi significativo (confirmado na Tabela 2) pois, os melhores valores de rendimento foram obtidos após 24h de secagem. Possivelmente pelo fato de os

maiores tempos no processo de secagem (48h e 72h) possibilitarem a continuidade da atividade metabólica da planta e a degradação do óleo essencial (MARTINAZZO, 2010), é que se observou menor rendimento em óleo. Segundo Simões e Spitzer (2003), a principal característica dos óleos essenciais é a volatilidade. Em geral não são estáveis, principalmente na presença de fatores como ar, luz, umidade, metais e calor. Sugere-se então que, quanto maior o tempo de secagem menor o rendimento de óleo obtido de folhas de capimannoni-2.

Observou-se nos experimentos realizados que o melhor rendimento em óleo, na maioria dos ensaios, foi com as folhas *in natura* (inteiras). Para Costa et al., (2005), em experimento realizado com capim limão, o rendimento de óleo essencial foi maior para folhas fragmentadas na forma de pó. Isso pode ter ocorrido devido a localização das estruturas secretoras das folhas. Segundo a literatura alterações mecânicas causadas no tecido vegetal, como redução do tamanho do material a ser seco, aumenta a taxa de secagem pela ruptura das células, facilitando o movimento de água e aumentando a superfície de evaporação, possibilitando menores perdas dos constituintes por meio da respiração do produto e das atividades enzimáticas (BARR, 1995).

Acredita-se também que essa contradição com a literatura ocorre devido ao longo tempo de extração que acabou interferindo nos resultados, uma vez que maior tempo de extração implica em perda de compostos voláteis (óleos essenciais). Oliveira (2012) demonstrou em seus estudos sobre o óleo essencial de menta, que após 60 minutos de hidrodestilação em aparelho de Clevenger ocorre a estabilização do rendimento em óleo.

5.2 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

A análise dos constituintes do óleo essencial de *Eragrostis Plana* Nees foi realizada através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG/MS). Essa análise identificou 11 componentes presentes no óleo essencial, a partir do espectro de massas em comparação com espectros existentes na Biblioteca NIST 08.

Para a identificação dos constituintes do óleo essencial foram analisadas três amostras escolhidas aleatoriamente. As figuras 7, 8 e 9 mostram os cromatogramas de amostras do óleo essencial de *Eragrostis Plana* Nees.

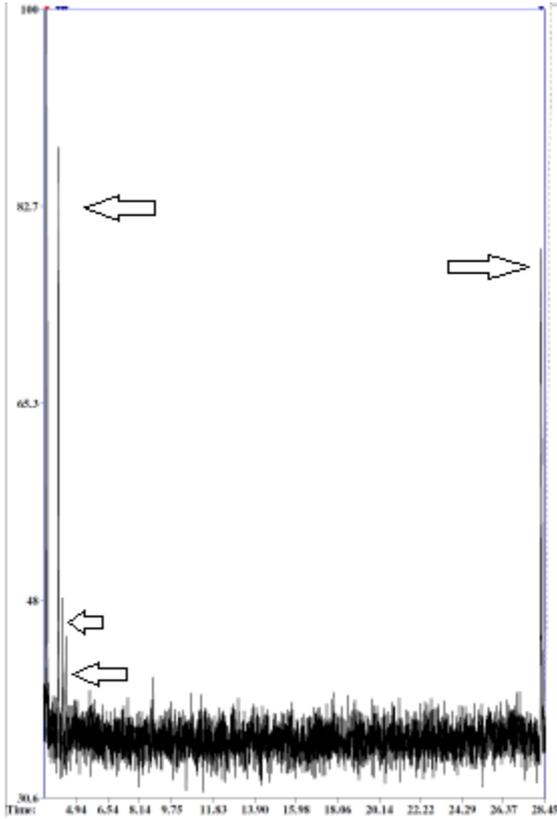


Figura 7 – Cromatograma 1 do óleo essencial de *Eragrostis plana* Nees

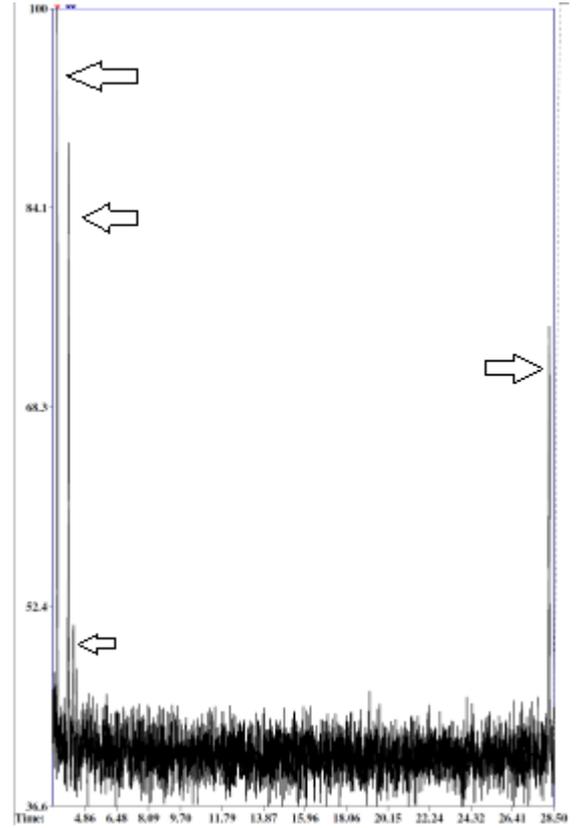


Figura 8 – Cromatograma 2 do óleo essencial de *Eragrostis plana* Nees

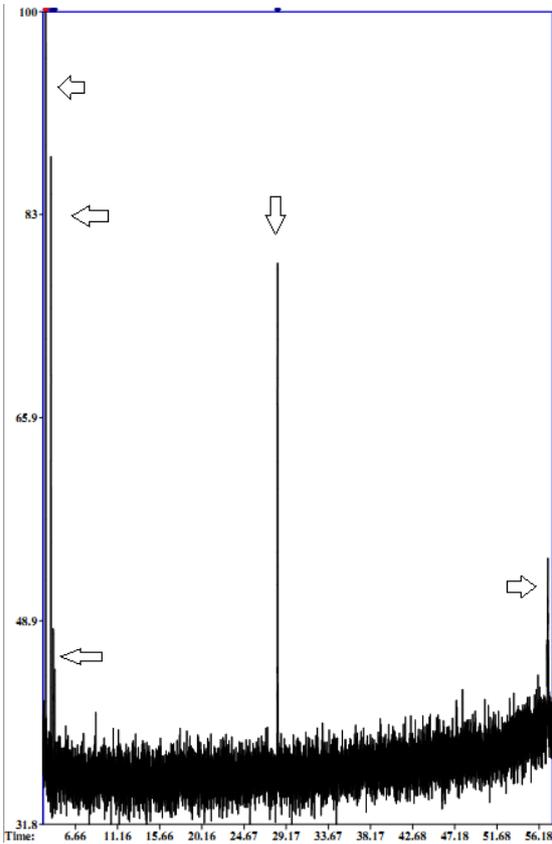


Figura 9 – Cromatograma 3 do óleo essencial de *Eragrostis plana* Nees

Analisando-se os cromatogramas, pode-se verificar uma grande semelhança na composição das três amostras analisadas, com exceção da amostra 3 que, além dos compostos observados nas amostras 1 e 2, apresentou um componente com tempo de retenção em 57,133 min. Observa-se também, por meio dos cromatogramas apresentados, que as amostras analisadas, possivelmente estavam muito diluídas, devendo ser considerada a possibilidade de que os compostos detectados e analisados não representem a totalidade, ou a maioria dos compostos presentes realmente no óleo essencial de capimannoni-2.

A importância da identificação dos componentes do óleo essencial de capimannoni-2, reside principalmente no fato de o mesmo apresentar potenciais propriedades alelopáticas (FERREIRA et al, 2008a).

Na tabela 4 são apresentados os constituintes identificados no óleo essencial de *Eragrostis Plana* Nees, com suas abundâncias (%) e tempos de retenção.

Tabela 4 - Compostos identificados no óleo essencial de *Eragrostis plana* Nees com seus respectivos tempos de retenção e abundâncias.

Compostos Presentes	Tempo de Retenção	Abundância (%)
1 hidróxi - propan -2-ona	3,476	1,56
2-metóxi-1-(2-nitroetil)-3-(fenilmetóxi)-benzeno	4,929	2,88
isobutilmetilcetona – benziloxima	4,448	6,02
Tetracloroetileno	3,500	7,99
2 metil - octa-4,6 -diin-3-ona,	4,347	8,61
hepta-3,5-diin-2-ona	4,302	10,29
Clorobenzeno	4,059	14,35
2-6-di-terc-butil - hidróxi—4- metil-benzeno	28,257	15,50
1,6,7,8-tetrahidro-1,6-dimetil-4-oxo - 4H-pirido [1,2-a] -pirimidina-3-carboxamida	28,276	16,02
2,4-bis-(terc-butil)-6-metil – fenol	28,271	16,75
Carbohidrazida	57,133	não relatado

Observa-se que os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de capimannoni-2 foram: 2-6-di-terc-butil – hidróxi-4-metil-benzeno (15,50%), 1,6,7,8-

tetrahydro-1,6-dimetil-4-oxo - 4H-pirido [1,2-a] -pirimidina-3-carboxamida (16,02%) e 2,4-bis-(terc-butil)-6-metil - fenol (16,75%), representando 48,27% da composição total de óleo.

As figuras 10, 11 e 12 mostram os espectros de massas e a estrutura química para os três compostos mais abundantes.

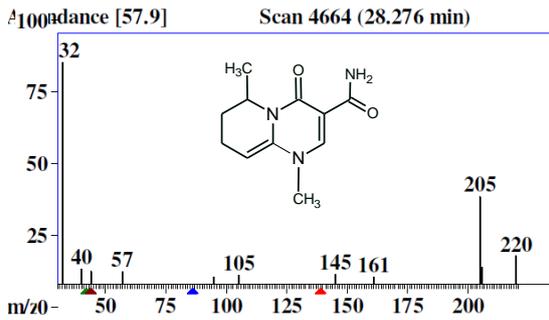


Figura 10 - Espectro de massas e estrutura química da 1,6,7,8-tetrahydro-1,6-dimetil-4-oxo - 4H-pirido [1,2-a] - pirimidina-3-carboxamida

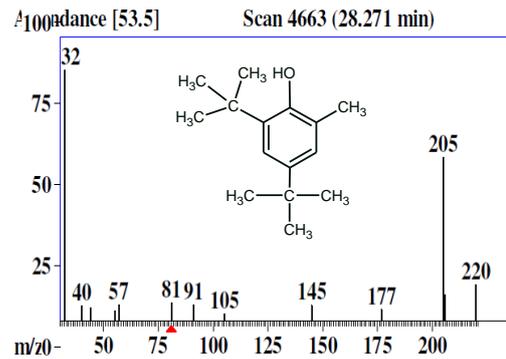


Figura 11 - Espectro de massas e estrutura química do 2,4-bis-(terc-butil)-6-metil - fenol

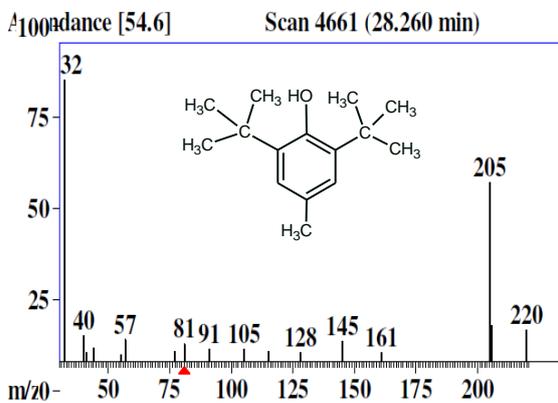


Figura 12 - Espectro de massas e estrutura química do 2,6-di-terc-butil-hidróxi-4-metil-benzeno

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a análise dos resultados, observa-se que quanto menor o tempo de secagem melhor o rendimento de óleo essencial, sendo assim, acredita-se que para melhorar a eficiência de extração poderia manter-se as 3 variáveis, quantidade de biomassa, superfície de contato e tempo de extração, fixas e diminuir o tempo de secagem. Além disso, o tempo de extração poderia ser menor, pois de acordo com os dados analisados, fornece o melhor rendimento, além de ser economicamente viável.

Com relação a quantidade de biomassa utilizada nos experimentos, observou-se que provavelmente não foi suficiente para proporcionar um volume de óleo essencial satisfatório para as análises, sendo recomendada uma nova avaliação, para continuação dessa pesquisa, relativa a quantidade de matéria prima a ser utilizada.

Considerando a escassez de literatura específica sobre as condições de extração do óleo essencial não só de capim Annoni-2, mas da espécie *Eragrostis*, bem como a ausência de estudos de identificação dos componentes do óleo essencial desta espécie, este trabalho representa uma grande contribuição. É importante ressaltar também, que este estudo apontou para a necessidade de continuidade das pesquisas (por meio de trabalhos subsequentes), com o intuito de determinar as melhores condições para obtenção de óleos essenciais, tanto do ponto de vista quantitativo quanto qualitativo, utilizando-se não apenas dos galhos, mas também das raízes da espécie *E. plana* Nees.

7 REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Júlio M.A. Química de Alimentos: Teoria e Prática, 4. ed. Minas Gerias: UFV, 2009.

ARRUDA, Marco A. Z.; PEREIRA-FILHO, Edenír R.; POPPI, Ronei J. Emprego De Planejamento Fatorial para a Otimização das Temperaturas de Pirólise e Atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 246-253, 2002.

BARR, A.G.; SMITH, D.M.; BROWN, D.M. Estimating forage yield and quality changes during field drying for hay. Model of dry-matter and quality losses. **Agricultural and Forest Meteorology**, v.76, p.83-105, 1995

BASER, Can Husnu K.; BUCHBAUER, Gerhard. Handbook of Essential Oils, Science, Tecnology and Aplications. United States of America: CRC Press. c. 16, p. 843-853, 2010.

CHIARADIA, Mariza C.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F. O Estado da Arte da Cromatografia Associada à Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos. **Química Nova**, v. 31, N. 3, p. 623-636, fev. 2008.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas SP: Editora Unicamp, 2006 p. 18-19.

COSTA, L.C.B.; CORREA, R.M.; CARDOSO, J.C.W.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FERRI, P.H. Secagem e fragmentacao da materia seca no rendimento e composicao do oleo essencial de capim-limao. Horticultura Brasileira, Brasilia, v.23, n.4, p.956-959, out-dez 2005.

COSTA, Emmanoel; TEIXEIRA, Sirlei D; MARQUES, Francisco A.; DUARTE, Marta C.T.; DELARMELENA, Camila; PINHEIRO, Maria Lúcia B.; TRIGO, José R.; MAIA, Beatriz Helena L.N. Sales. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon Guatteropsis species. Phytochemistry, Curitiba, 2008.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento Fatorial: uma Ferramenta Estatística Valiosa para a Definição de Parâmetros Experimentais Empregados na Pesquisa Científica. Visão Acadêmica, Curitiba, v.9, n.1, jun. 2008.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. Cromatografia um Breve Ensaio. **Química Nova**, n. 7, mai. 1998. <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/atual.pdf>

FERREIRA Nadilson R.; MEDEIROS Renato B. de; SOARES, Geraldo Luiz G. (2008a) Potencial alelopático do Capim-Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. Revista Brasileira de Semente, Porto Alegre, v. 30, p. 43-50, 2008. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v30n2/a06v30n2.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2011.

FERREIRA Nadilson R.; MEDEIROS Renato B. de; FAVRETO, Rodrigo (2008b) Banco de Sementes do Solo de Margem Viária Dominada por Capim Annoni-2 Sujeito a Controle com Distúrbios no Solo e Introdução de Gramíneas. Revista Brasileira de Semente, Porto Alegre, v. 30, p. 54-63, 2008. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v30n3/08.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2011.

KISSMANN, Gottfried Kurt. Plantas infestantes e nocivas. São Paulo: BASF Brasileira S.A. p: 421-424, 1991.

LIMA, Anderson B. de; SANTANA, Maxwell B.; CARDOSO, Alessandra S.; SILVA, Joyce Kelly R. da; MAIA, José Guilherme S.; CARVALHO, José Carlos T.; SOUSA, Pergentino José C. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of Aniba canelilla essential oil. *Phytomedicine, Pará*, v. 16, p. 555-559, 2009. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiailImageURL&_cid=273188&_user=684709&_pii=S0944711308001943&_check=y&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_coverDate=2009-06-30&wchp=dGLbVIS-zSkWz&md5=6ff8463642d4cab8270e935011ea4f5a/1-s2.0-S0944711308001943-main.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2011.

MARTINAZZO A.P.; MELO E.C.; CORRÊA P.C.; SANTOS R.H.S. Modelagem matemática e parâmetros qualitativos da secagem de folhas de capim-limão [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf]. **Revista Brasileira de Plantas Medicionais**. Butucatu –SP, v. 12, n. 4, 2010.

MORAIS, Lilia Aparecida Salgado de. Influência de Fatores Abióticos na Composição Química dos Óleos Essenciais. Embrapa, 2009.

NETO, Francisco Radler de Aquino; NUNER, Denise da Silva e Souza. Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: INTERCIÊNCIA, 2003 p. 71.

NETO, Benício de Barros; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. 4º ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

OLIVEIRA, Ariana RMF de; JEZLER, Caroline N; OLIVEIRA, Rosilene A; MIELKE, Marcelo S; COSTA, Larissa CB. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. **Horticultura Brasileira** v. 30, n. 1, p. 155-159, 2012.

PACHECO, Susi Missel et al. Morcegos no Brasil: Biologia, sistemática, ecologia e conservação. 1. ed. Porto Alegre: Armazém Digital Comunicação Ltda, 2008.

PINHEIRO, B.G, SILVA, A.S.B., SOUZA, G.E.P., FIGUEIREDO, J.G., CUNHA, F.Q., LAHLOU, S., SILVA, J.K.R. da, MAIA, J.G.S., SOUSA, P.J.C. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *Journal of Ethnopharmacolog, Pará*, 29 set. 2011. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiailImageURL&_cid=271283&_user=684709&_pii=S0378874111007082&_check=y&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_coverDate=2011-11-18&wchp=dGLbVIB-zSkzV&md5=3ad72993695db1001c643a7b621c5ca7/1-s2.0-S0378874111007082-main.pdf>. Acesso em 18 nov. 2011.

RUSCONI, Bruno. Um Problema a Conocer: Capim Annoni em Uruguay. Almanaque, 2007.

SANTOS Silva A.; ALVES Mello de S.; CÂMARA José F.; NETO Gomes da Rocha O. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. Embrapa, Belém, p 1-3.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. p.467-95.

SIQUEIRA, Rodrigo José Bezerra de; MACEDO, Francisco Igor Bulcão; INTERAMINENSE, Leylliane de Fátima Leal; DUARTE, Gloria Pinto; MAGALHÃES, Pedro Jorge Caldas; BRITO, Teresinha Silva; SILVA, Joyce Kelly Rosário da; MAIA, José Guilherme Soares; SOUSA, Pergentino José da Cunha; CARDOSO, José Henrique Leal; LAHLO, Saad. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. European Journal of Pharmacology, Pernambuco, 18 abr. 2010. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=271077&_user=684709&_pii=S0014299910002906&_check=y&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_coverDate=2010-07-25&wchp=dGLbVIB-zSkzV&md5=b68e66d186b0c93684f3684fb6548606/1-s2.0-S0014299910002906-main.pdf>. Acesso em: 30 set. 2011.

SOLOMOS, T. W. Graham; FRYHLE, Craig B. Química Orgânica. 1 v. 9 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009 p. 382, 383 e 396.

THORMAR, Halldor. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. Iceland: A John wiley and Sons Ltd., Publication. c. 11, p.. 265-266, 2011.