



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB**

**CARLA DE FATIMA ALVES NONATO**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-  
ACETILCOLINESTERASE, ANSIOLÍTICA E ANTIBACTERIANA DE ESPÉCIES  
DO GÊNERO *Lippia* L. (VERBENACEAE) DO CARIRI CEARENSE**

**CRATO - CE**

**2022**



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB**

**CARLA DE FATIMA ALVES NONATO**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-  
ACETILCOLINESTERASE, ANSIOLÍTICA E ANTIBACTERIANA DE ESPÉCIES  
DO GÊNERO *Lippia* L. (VERBENACEAE) DO CARIRI CEARENSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Química Biológica.

Orientador:

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

**CRATO - CE**

**2022**

Ficha Catalográfica elaborada pelo autor através do sistema  
de geração automático da Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri - URCA

Nonato, Carla De Fatima Alves

N812c CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,  
ANTI-ACETILCOLINESTERASE, ANSIOLÍTICA E ANTIBACTERIANA DE  
ESPÉCIES DO GÊNERO *Lippia* L. (VERBENACEAE) DO CARIRI CEARENSE  
/ Carla De Fatima Alves Nonato. Crato-CE, 2022.

178p. il.

Tese. Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade  
Regional do Cariri - URCA.

Orientador(a): Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

1.Lippia, 2.Antioxidante, 3.Anti-AChE, 4.Ansiolítico, 5.Antimicrobiano;  
I.Título.

CDD: 572.8

**CARLA DE FATIMA ALVES NONATO**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-  
ACETILCOLINESTERASE, ANSIOLÍTICA E ANTIBACTERIANA DE ESPÉCIES  
DO GÊNERO *Lippia* L. (VERBENACEAE) DO CARIRI CEARENSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Química Biológica.

**Tese defendida e aprovada em: 29/07/2022.**

**Banca examinadora:**

---

**Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa**  
**Orientador - URCA**

---

**Prof. Dr. Raimundo Nonato Pereira Teixeira**  
**Membro Titular Interno – URCA**

---

**Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos**  
**Membro Titular Interno - UVA**

---

**Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima**  
**Membro Titular Externo – UFPI**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Rolim Campos Barros**  
**Membro Titular Externo - UNIFOR**

---

**Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho**  
**Membro Suplente Interno -URCA**

---

**Prof. Dr. Jaime Ribeiro-Filho**  
**Membro Suplente Externo – Fiocruz**

**CRATO - CE**

**2022**

Dedico aos meus pais e irmãos, pelo incentivo,  
apoio e carinho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar e iluminar meu caminho, dando coragem e sabedoria.

Aos meus pais, Carlos Alberto e Maria de Fátima, por nunca medirem esforços para minha formação e pelo incentivo para sempre buscar meus objetivos.

Aos meus irmãos, Caio Francys e Francisca Maria, pelo apoio, amizade e carinho.

A Tarcisio, pelo amor, compreensão, ajuda e alento.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa, pela confiança, disponibilidade, por todos os ensinamentos e pelo exemplo como professor e pesquisador.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN), por toda a ajuda, companheirismo, encorajamento e descontrações.

Ao Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA), da Universidade Federal da Paraíba, pela parceria nas análises da composição química dos óleos essenciais e extratos, em especial ao prof. Dr. Josean Fechine Tavares.

Ao Laboratório de Análises Cromatográficas e Espectroscópicas (LACES), pela parceria nos ensaios de inibição da acetilcolinesterase, em especial a prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selene Maia de Moraes.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN-S), da Universidade Estadual do Ceará, pela parceria nos ensaios com Zebrafish, em especial ao prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos.

Ao prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, pela parceria nas análises multivariadas.

A coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, por todo o apoio.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram e incentivaram a realização deste trabalho.

**Muito obrigada!**

“Estou preso ao meu pensamento  
Como o vento preso ao ar.”  
(Fernando Pessoa)

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figure 1.** Antioxidant activity of the essential oils of *L. alba*, *L. sidoides* and *L. gracilis* by different mechanisms. A: DPPH free radical scavenging; B: ABTS radical sequestration; C: Deoxyribose protection; D:  $\text{Fe}^{3+}$  reduction; E:  $\text{Fe}^{2+}$  chelation; F: Inhibition of linoleic acid degradation. Ascorbic acid was used as a standard antioxidant control. \*:  $P < 0.05$ . Data were analyzed by ANOVA and Tukey's post hoc test. .... 83
- Figure 2.** Principal Component Analysis Biplot (*Score e loading*) showing correlations between the chemical compositions and antioxidant activities of *Lippia* L. essential oils. .... 83
- Figure 3.** Heatmap cluster analysis of *Lippia* species and variables (chemical composition and antioxidant activity). .... 85

### CAPÍTULO 2

- Figure 1.** Main compounds identified in the ethanolic extracts of *L. alba*, *L. sidoides* and *L. gracilis*. Compounds: 1. Acteoside; 2. Apigenin; 3. Apigenin-7-*O*-glucuronide; 4. Chrysoeriol; 5. Cirsimaritin; 6. Emodin-8-*O*-glicoside; 7. Eriodictyol; 8. Geniposidic acid; 9. Iso-orientin; 10. Isorhamnetin; 11. Loganic acid; 12. Loganin; 13. Luteolin; 14. Luteolin-6-*O*-glicoside; 15. Monotropein; 16. Naringenin; 17. Orientin; 18. Quercetin; 19. Shanzhiside methyl ester; 20. Taxifolin; 21. Tricin-7-*O*-glucuronide; 22. Tuberonic acid glucoside. .... 105
- Figure 2.** Antioxidant activity of the ethanolic extracts of *L. alba* (LaEE), *L. sidoides* (LsEE) and *L. gracilis* (LgEE) by different mechanisms. A: DPPH free radical scavenging; B: ABTS radical sequestration; C: Deoxyribose protection; D:  $\text{Fe}^{3+}$  reduction; E:  $\text{Fe}^{2+}$  chelation; F: Inhibition of linoleic acid degradation. Ascorbic acid was used as a standard antioxidant control. \*:  $P < 0.05$ . Data were analyzed by ANOVA and Tukey's post hoc test. .... 106
- Figure 3.** Inhibition of AChE promoted by ethanolic extracts of *L. alba* (A), *L. sidoides* (B) and *L. gracilis* (C) at different times. .... 107
- Figure 4.** The biplot of PCA describing data sets obtained from the chemical compositions, antiradical assay (DPPH, ABTS, Desoxirribose, Reduction of  $\text{Fe}^{3+}$ , Chelating  $\text{Fe}^{2+}$  and Cooxidation) and biological activity (Acetylcholinesterase inhibition) of *Lippia* extracts.... 107
- Figure 5.** Heatmap of variables based on chemical composition and biological properties present in ethanolic extract of *Lippia* species. .... 108

### CAPÍTULO 3



- Figura 1.** Efeito modulador dos óleos essenciais de *L. alba* (LaEO), *L. sidoides* (LsEO) e *L. gracilis* (LgEO) sobre a atividade antibiótica de amicacina, gentamicina, benzilpenicilina e cefalotina contra cepas de *Staphylococcus aureus* Sa 358 (A) e *Escherichia coli* Ec 27 (B). Sin.: Sinergismo; Ant.: Antagonismo; \*:  $p < 0,05$  (ANOVA e teste de Bonferroni). ..... 118
- Figura 2.** Efeito modulador dos extratos etanólicos de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis* sobre a atividade antibiótica de amicacina, gentamicina, benzilpenicilina e cefalotina contra *Staphylococcus aureus* Sa 358 (A) e *Escherichia coli* Ec 27 (B). Sin.: Sinergismo; Ant.: Antagonismo; \*:  $p < 0,05$  (ANOVA e teste de Bonferroni). ..... 119
- Figura 3.** Efeito dos óleos essenciais e extratos etanólicos de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracillis* sob o comportamento locomotor do zebrafish adulto no Teste de Campo Aberto (0–5 min). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média para 6 animais/grupo; ANOVA seguido pelo teste de Tukey (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , vs. controle; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  vs DZP). LaEO: óleo essencial de *Lippia alba*; LsEO: óleo essencial de *Lippia sidoides*; LgEO: óleo essencial de *Lippia gracilis*; LaEE: extrato etanólico de *Lippia alba*; LsEE: extrato etanólico de *Lippia sidoides*; LgEE: Extrato etanólico de *Lippia gracilis*; DZP: Diazepam. 121
- Figura 4.** Efeito dos óleos essenciais e extratos etanólicos de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracillis* sob o comportamento de ansiedade de zebrafish adulto no Teste claro e escuro (0–5 min). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média para 6 animais/grupo; ANOVA seguido pelo teste de Tukey (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , vs. controle). LaEO: óleo essencial de *Lippia alba*; LsEO: óleo essencial de *Lippia sidoides*; LgEO: óleo essencial de *Lippia gracilis*; LaEE: extrato etanólico de *Lippia alba*; LsEE: extrato etanólico de *Lippia sidoides*; LgEE: Extrato etanólico de *Lippia gracilis*; DZP: Diazepam. .... 123
- Figura 5.** Mecanismo de ação GABAérgica dos óleos essenciais e extratos etanólicos de de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracillis* sob o comportamento de ansiedade de zebrafish adulto no Teste claro e escuro (0–5 min). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média para 6 animais/grupo; two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey (\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , vs. controle; #  $p < 0,05$ , ###  $p < 0,0001$  vs DZP ou *Lippia*). LaEO: óleo essencial de *Lippia alba*; LsEO: óleo essencial de *Lippia sidoides*; LgEO: óleo essencial de *Lippia gracilis*; LaEE: extrato etanólico de *Lippia alba*; LsEE: extrato etanólico de *Lippia sidoides*; LgEE: Extrato etanólico de *Lippia gracilis*; DZP: Diazepam; Fmz: Fumazenil. .... 123
- Figura 6.** Efeito do extrato etanólico de *L. alba* após pré-tratamento com ciproheptadina (A), pizotifeno (B) e granisetron (C) em zebrafish adulto no teste claro/escuro (0-5 min). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média para 6 animais/grupo; two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , vs. controle; ##  $p < 0,01$ ,

# # # #  $p < 0,0001$  vs Flx ou *Lippia*). LaEE: extrato etanólico de *Lippia alba*; Cypro: ciproheptadina; Piz: pizotifeno; Gstn: granisetron; Flx: Fluoxetina. .... 124

## LISTA DE TABELAS

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

**Tabela 1.** Usos tradicionais de espécies do gênero *Lippia* L..... 21

**Tabela 2.** Atividades biológicas das espécies do gênero *Lippia* L. .... 23

#### CAPÍTULO 1

**Table 1.** Chemical compounds identified in the essential oils of *L. alba*, *L. sidoides* and *L. gracilis*..... 80

**Table 2.** IC<sub>50</sub> values of the essential oils of *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis* obtained through different antioxidant mechanisms. .... 82

#### CAPÍTULO 2

**Table 1.** Total content of phenols and flavonoids, IC<sub>50</sub> obtained by the ethanolic extracts of *L. alba*, *L. sidoides* and *L. gracilis* and by the positive controls for different activities tested. . 104

#### CAPÍTULO 3

**Tabela 1.** Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos. .... 113

**Tabela 2.** Concentrações inibitórias mínimas dos óleos essenciais e extratos etanólicos de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis*. .... 116

**Tabela 3.** Toxicidade aguda dos óleos essenciais e extratos etanólicos de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis*. .... 120

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE.....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Objetivo geral.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Gênero <i>Lippia</i> L. ....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.1. Usos tradicionais .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.2. Atividades biológicas e composição química.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Espécies reativas e estresse oxidativo.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3. Antioxidantes naturais .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4. Óleos essenciais .....</b>	<b>36</b>
<b>3.5. Resistência de microrganismos .....</b>	<b>37</b>
<b>3.6. Transtornos de ansiedade .....</b>	<b>39</b>
<b>3.7. Quimiometria .....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>

### CAPÍTULO 1

<b>Comparative Analysis of Chemical Profiles and Antioxidant Activities of Essential Oils Obtained from Species of <i>Lippia</i> L. by Chemometrics.....</b>	<b>64</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>65</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>66</b>
<b>2. Materials and methods.....</b>	<b>67</b>
<i>2.1. Botanical material and essential oil extraction.....</i>	<i>67</i>
<i>2.2. Chemicals and solvents .....</i>	<i>68</i>
<i>2.3. Essential oil analysis .....</i>	<i>68</i>
<i>2.4. Antioxidant activity analysis.....</i>	<i>68</i>
<i>2.4.1. DPPH free radical scavenging.....</i>	<i>68</i>
<i>2.4.2. ABTS<sup>•+</sup> free radical capture.....</i>	<i>69</i>
<i>2.4.3. Deoxyribose oxidative degradation assay .....</i>	<i>69</i>

2.4.4. Fe <sup>2+</sup> -chelating activity and Fe <sup>3+</sup> -reducing power test.....	69
2.4.5. Co-oxidation of $\beta$ -carotene/Linoleic acid method.....	70
2.5. <i>Statistical analysis</i> .....	70
<b>3. Results and Discussion</b> .....	70
3.1. <i>Essential oil analysis</i> .....	70
3.2. <i>Antioxidant activity</i> .....	71
3.3. <i>Multivariate analysis</i> .....	74
<b>4. Conclusions</b> .....	75
<b>References</b> .....	76

## CAPÍTULO 2

<b>Chemical characterization, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of <i>Lippia</i> L. species compared by chemometric calculations</b> .....	86
<b>Abstract</b> .....	87
<b>1. Introduction</b> .....	88
<b>2. Methodology</b> .....	89
2.1. <i>Plant material and extract obtention</i> .....	89
2.2. <i>Chemicals and solvents</i> .....	89
2.3. <i>Chemical composition</i> .....	89
2.3.1. Quantification of total phenols .....	89
2.3.2. Quantification of total flavonoids.....	90
2.3.3. Analysis of compounds by HPLC-DAD-ESI-MSn.....	90
2.4. <i>Antioxidant activity</i> .....	90
2.4.1. DPPH free radical scavenging.....	90
2.4.2. ABTS <sup>•+</sup> free radical capture.....	91
2.4.3. Deoxyribose oxidative degradation assay .....	91
2.4.4. Fe <sup>2+</sup> -chelating activity and Fe <sup>3+</sup> -reducing power test.....	91
2.4.5. Co-oxidation of $\beta$ -carotene/Linoleic acid method.....	92
2.5. <i>Acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity</i> .....	92
2.6. <i>Statistical analysis</i> .....	92
<b>3. Results and Discussion</b> .....	93
3.1. <i>Chemical composition</i> .....	93
3.2. <i>Antioxidant activity</i> .....	95
3.3. <i>AChE inhibitory activity</i> .....	96
3.4. <i>Multivariate analysis</i> .....	96

<b>4. Conclusion</b> .....	98
<b>References</b> .....	99

### **CAPÍTULO 3**

<b>Atividade antibacteriana, toxicidade e efeito ansiolítico via neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica de espécies do gênero <i>Lippia</i> L. em Zebrafish adultos</b> .	109
--	-----

<b>Resumo</b> .....	110
---------------------	-----

<b>1. Introdução</b> .....	111
----------------------------	-----

<b>2. Metodologia</b> .....	112
-----------------------------	-----

<i>2.1. Material vegetal e obtenção dos extratos</i> .....	112
--	-----

<i>2.2. Drogas e reagentes</i> .....	112
--------------------------------------	-----

<i>2.3. Atividade antibacteriana</i> .....	112
--	-----

<i>2.3.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i> .....	112
--	-----

<i>2.3.2. Avaliação da Modulação por Contato Direto</i> .....	113
---	-----

<i>2.4. Bioensaios com Zebrafish</i> .....	113
--	-----

<i>2.4.1. Animais</i> .....	113
-----------------------------	-----

<i>2.4.2. Toxicidade aguda 96 h</i> .....	114
---	-----

<i>2.4.3. Avaliação da atividade locomotora (teste de campo aberto)</i> .....	114
---	-----

<i>2.4.4. Avaliação Ansiolítica (Teste claro-escuro)</i> .....	114
--	-----

<i>2.4.5. Avaliação da neuromodulação GABAérgica</i> .....	115
--	-----

<i>2.4.6. Avaliação da neuromodulação serotoninérgica</i> .....	115
---	-----

<i>2.5. Análise estatística</i> .....	115
---------------------------------------	-----

<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	116
--	-----

<i>3.1. Atividade antibacteriana</i> .....	116
--	-----

<i>3.2. Bioensaios com Zebrafish</i> .....	120
--	-----

<b>4. Conclusão</b> .....	125
---------------------------	-----

<b>Referências</b> .....	125
--------------------------	-----

<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	131
-----------------------------------	-----

<b>APÊNDICES</b> .....	132
------------------------	-----

<b>ANEXOS</b> .....	176
---------------------	-----

## Caracterização química e atividades antioxidante, anti-acetilcolinesterase, ansiolítica e antibacteriana de espécies do gênero *Lippia* L. (Verbenaceae) do Cariri cearense

### RESUMO

Plantas medicinais tem se mostrado como importante ferramenta para a busca de novas drogas, auxiliando no descobrimento de novos compostos fitoquímicos e de diferentes mecanismos de ação farmacológica. As espécies de *Lippia* L. ganham destaque devido a importância dos usos tradicionais em que são aplicadas nas partes do mundo onde se distribuem, sendo estes principalmente medicinal e alimentício. Este estudo teve como objetivo caracterizar e comparar a composição química volátil e não-volátil de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson, *Lippia sidoides* Cham. e *Lippia gracilis* Schauer e avaliar suas atividades antioxidante, anti-acetilcolinesterase, ansiolítica e antibacteriana. A identificação da composição química dos óleos essenciais e dos extratos etanólicos se deu por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Espectrômetro de Massas com Ionização por Eletrospray (HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>), respectivamente. A capacidade antioxidante foi verificada pelo sequestro dos radicais livres 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), poder de redução e quelação de ferro, proteção da desoxirribose e co-oxidação do ácido linoleico, e a atividade de inibição da acetilcolinesterase foi avaliada. A atividade antimicrobiana foi determinada pela concentração inibitória mínima e pela modulação de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos e beta-lactâmicos. A toxicidade e efeito ansiolítico foram avaliados pelo modelo Zebrafish. Os óleos essenciais apresentam composições químicas sem relação entre si. Estes apresentam atividade antioxidante relevante, correlacionada a ação de compostos distintos e não-majoritários, com destaque para o óleo essencial de *L. sidoides* com IC<sub>50</sub> de 5,22 µg/mL para inibição do ABTS. Já os extratos, apresentaram composições ricas em compostos fenólicos, especialmente a classe dos flavonoides e com atividade antioxidante significativa, com destaque para o extrato de *L. gracilis* com IC<sub>50</sub> de 0,59 µg/mL para quelação de Fe<sup>2+</sup>. Estes também apresentaram atividade inibidora de enzima acetilcolinesterase com concentrações clinicamente relevantes. Quanto a atividade antibacteriana, todas as amostras se mostraram eficazes frente as linhagens testadas. Na modulação, tanto os óleos essenciais quanto os extratos modificaram a ação dos antibióticos testados, onde o efeito sinérgico mais significativo foi obtido pelo extrato etanólico de *L. alba* frente a *Staphylococcus aureus*, diminuindo o valor da CIM da amicacina de 853,3 µg/mL para 32 µg/mL. As amostras não foram tóxicas em 96 h de exposição em Zebrafish nas concentrações testadas e apresentaram efeito ansiolítico, neuromodulando o receptor GABA<sub>A</sub>. O extrato de *L. alba* neuromodulou o receptor 5-TH. Assim, diante dos resultados obtidos, as espécies do gênero *Lippia* em estudo mostram potencial biológico promissor.

**Palavras-Chave:** *Lippia*; Monoterpenos; Compostos fenólicos; Antioxidante; Anti-AChE; Antimicrobiano; Ansiolítico; Zebrafish.

**Chemical characterization, antioxidant, anti-acetylcholinesterase, anxiolytic and antibacterial activities of species of the genus *Lippia* L. (Verbenaceae) from Cariri Ceará**

**ABSTRACT**

Medicinal plants have been shown to be an important tool for the search for new drugs, helping to discover new phytochemical compounds and different mechanisms of pharmacological action. *Lippia* L. species are highlighted due to the importance of the traditional uses in which they are applied in the parts of the world where they are distributed, being these mainly medicinal and food. This study aims to characterize and compare the volatile and fixed chemical composition of *Lippia alba* (Mill.) NEBr. ex Britton & P.Wilson, *Lippia sidoides* Cham. and *Lippia gracilis* Schauer and evaluate their antioxidant, anti-acetylcholinesterase, anxiolytic and antibacterial activities. The identification of the chemical composition of essential oils and ethanol extracts was done by Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (CG/MS) and High Performance Liquid Chromatography coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometer (HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>), respectively. The antioxidant capacity was verified by the scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radicals, iron reduction and chelation power, deoxyribose protection and co-oxidation of linoleic acid, and the acetylcholinesterase inhibition activity was evaluated. The antimicrobial activity was determined by the minimal inhibitory concentration and the modulation of antibiotics of the aminoglycoside and beta-lactam class. Toxicity and anxiolytic effect were evaluated by the Zebrafish model. Essential oils have unrelated chemical compositions. These have relevant antioxidant activity, correlated with the action of distinct and non-majority compounds, especially the essential oil of *L. sidoides* with IC<sub>50</sub> of 5.22 µg/mL for inhibition of ABTS. The extracts, on the other hand, showed compositions rich in phenolic compounds, especially the class of flavonoids, and with significant antioxidant activity, especially the extract of *L. gracilis* with IC<sub>50</sub> of 0.59 µg/mL for Fe<sup>2+</sup> chelation. These also showed acetylcholinesterase enzyme inhibitory activity at clinically relevant concentrations. As for antibacterial activity, all samples were effective against the strains tested. In the modulation, both essential oils and extracts modified the action of the tested antibiotics, where the most significant synergistic effect was obtained by the ethanol extract of *L. alba* leaves against *Staphylococcus aureus*, decreasing the MIC value of amikacin from 853.3 µg/ml to 32 µg/ml. The samples were not toxic in 96 h of exposure in Zebrafish at the concentrations tested and showed an anxiolytic effect, neuromodulating the GABA<sub>A</sub> receptor. *L. alba* extract neuromodulated the 5-TH receptor. Thus, in view of the results obtained, the species of the genus *Lippia* under study demonstrate promising biological potential.

**Keywords:** *Lippia*; Monoterpenes; Phenolic compounds; Antioxidant; Anti-AChE; Antimicrobial; Anxiolytic; Zebrafish.



## IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE

Pesquisas que buscam identificar a composição química e avaliar as atividades farmacológicas de espécies medicinais e alimentícias são importantes para validação de seus usos. As conhecidas cidreiras ou alecrins (*Lippia* L.) são utilizados para o tratamento de diferentes enfermidades através de seu consumo como chás, temperos e em banhos, estando essas ações associadas aos seus componentes químicos. Este estudo mostrou que espécies deste gênero apresentam potencial terapêutico para auxiliar na prevenção ou tratamento de doenças neurodegenerativas e ansiedade, como também de infecções antibacterianas. Assim, estes resultados servem de base para estudos que procurem desenvolver novas medicações e conservantes para alimentos.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pela humanidade atravessa gerações por meio da experiência adquirida mediante utilização prévia, sendo este muitas vezes a única alternativa terapêutica para o tratamento e prevenção de doenças de diferentes comunidades (SALVINO, 2020). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta o uso de partes de plantas medicinais: folhas, cascas, raízes ou flores, como opção terapêutica dentro do Sistema Único de Saúde (SUS), através de resoluções que estabelecem quais, como e quando as ditas drogas vegetais devem ser utilizadas (FLOR; BARBOSA, 2015). Este cenário promove o aumento da prescrição destes vegetais por profissionais de saúde da assistência básica e do seu uso pela população em geral (SANTOS; MARTINS; NASCIMENTO, 2020).

Por meio deste conhecimento tradicional, estudos de cunho etnofarmacológico tem se mostrado como importante ferramenta para a busca de novas drogas, gerando conhecimento para a produção de novos medicamentos e auxiliando na manutenção da saúde de todas as camadas sociais (ALBUQUERQUE; RAMOS; MELO, 2012; AÑEZ, 2009). Estes estudos são essenciais para o resgate de dados sobre espécies com potencial medicinal, auxiliando no descobrimento de novos compostos fitoquímicos e de diferentes mecanismos de ação farmacológica vegetal, além de fornecer informações importantes acerca de segurança de uso para ensaios de toxicidade (OTENIO et al., 2020).

O conhecimento sobre os compostos obtidos pelo metabolismo secundário vegetal detém grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). Devido à diversidade estrutural desses metabólitos, a recente modernização das metodologias de isolamento e identificação de compostos de fontes naturais tem propiciado o aumento no número de novas estruturas químicas bioativas para diversas indicações terapêuticas, como antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, dentre outras (BRANDÃO et al., 2010; MA et al., 2016; MACHADO et al., 2008).

Essa diversidade se dá tanto por fatores genéticos quanto ambientais e seu conhecimento é essencial para uso adequado destes recursos, já que a variabilidade química dentro de determinada espécie ou gênero permite selecionar aqueles indivíduos que apresentam composição química de interesse. Esses constituintes químicos também servem de base para estudos de classificação quimiotaxonômica, já que as estruturas químicas dos metabólitos secundários e suas vias biossintéticas são frequentemente específicas e restritas a organismos taxonomicamente relacionados, conhecidos como quimiovariedades ou apenas quimiotipos (SANFELIU, 2015; SINGH; GEETANJALI, 2018).

Entre os principais fatores bióticos e abióticos que afetam o metabolismo secundário vegetal, tanto no conteúdo total quanto nas proporções relativas desses compostos, estão sazonalidade (GOUVEA et al., 2012), ritmo circadiano (BELBIN et al., 2019), desenvolvimento vegetal (LI et al., 2020), fenologia (RIBEIRO et al., 2019), temperatura (SHAMLOO et al., 2017), altitude e nutrientes (HASHIM et al., 2020), estresse hídrico (CASER et al., 2019), radiação UV (GHASEMZADEH et al., 2016), dentre outros.

Neste sentido, gênero *Lippia* L. ganha destaque devido a importância dos usos tradicionais em que é aplicado nas diversas partes do mundo onde se distribui, sendo estes principalmente medicinal e alimentício (PASCUAL et al., 2001). Suas espécies seguem um perfil geral de uso, sendo principalmente utilizadas na forma de infusão e decocto de suas folhas, partes aéreas ou flores e administradas por via oral como sedativo e hipertensivo, bem como para o tratamento de distúrbios dos sistemas respiratório e digestivo (ALBUQUERQUE et al., 2007; NELO, 2018).

Este gênero caracteriza-se por apresentar espécies aromáticas, tendo sua constituição volátil amplamente explorada em trabalhos de cunho fármaco-químico, porém sua composição não volátil também apresenta compostos relevantes como flavonoides, iridoides, fenilpropanoides glicosilados e naftoquinonas (GÜERECÁ et al., 2007; JESUS, 2018). Os flavonoides, encontrados em maior abundância nesse gênero, possuem uma gama de atividades biológicas, como antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, antineoplásico, antioxidante, antihepatotóxico, anti-hipertensivo, hipolipidêmico, anti-inflamatório, antiplaquetário, dentre outros (MACHADO et al., 2008).

Apesar de estudos realizados demonstrarem a importância do gênero *Lippia* L. para a fitoterapia, devido a usos terapêuticos apresentados pelas populações tradicionais, e de suas diferentes espécies já terem sido identificadas e caracterizadas, ainda existe escassez de trabalhos publicados ou detalhados de suas atividades farmacológicas, associados a identificação ou isolamento químico (MAGALHÃES, 2018; SOUSA, 2008).

Além disso, de modo geral, os membros desse gênero apresentam similaridades em sua constituição química, atividades farmacológicas e usos populares, sendo reconhecido por sua composição volátil, que caracteriza a maior parte dos trabalhos relacionados as suas atividades biológicas, mostrando assim, a necessidade de estudos que envolvam outras classes de metabolitos secundários presentes, buscando estabelecer aspectos biológicos e dados quimiotaxônicos mais consistentes (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011; JESUS, 2018; MAGALHÃES, 2018; SOARES, 2001).

Diante do exposto, este estudo buscou caracterizar e comparar a composição química volátil e não-volátil das espécies *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson, *Lippia*

*sidoides* Cham. e *Lippia gracilis* Schauer presentes no Cariri cearense a fim de verificar similaridade entre os seus compostos, bem como avaliar suas capacidades antioxidante, inibidora da acetilcolinesterase, antibacteriana, ansiolítica e sua toxicidade, verificando a influência da constituição química sobre essas bioatividades.

Os resultados da pesquisa estão apresentados em três capítulos, subsequentes, após a fundamentação teórica. O primeiro capítulo mostra o estudo com os óleos essenciais das três espécies estudadas, destacando a composição química, analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), e atividade antioxidantes por diferentes mecanismos, relacionados através de cálculos quimiométricos. Este capítulo corresponde ao artigo publicado na revista Food Chemistry intitulado ‘Comparative analysis of chemical profiles and antioxidant activities of essential oils obtained from species of *Lippia* L. by chemometrics’.

O segundo capítulo relata sobre os extratos etanólicos das três espécies, mostrando a composição química, analisada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>), e as atividades antioxidante e anti-acetilcolinesterase, também correlacionadas por quimiometria. Por fim, o terceiro capítulo aborda as atividades antibacteriana e moduladora frente a cepas multirresistentes, bem como atividade ansiolítica via neuromodulação GABAérgica e serotoninérgica e toxicidade em Zebrafish adultos para os óleos essenciais e extratos etanólicos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Caracterizar e comparar quimicamente as espécies de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis* do Cariri cearense e avaliar atividades biológicas específicas.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar os constituintes químicos voláteis e não-voláteis das espécies estudadas;
- Comparar a constituição química dos óleos essenciais e extratos etanólicos das espécies estudadas através de análises quimiométricas;
- Avaliar a capacidade antioxidante das espécies estudadas por diferentes mecanismos, como sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS, proteção da desoxirribose e  $\beta$ -caroteno, quelação e redução de íons de ferro;
- Avaliar a atividade antibacteriana, através da Concentração inibitória mínima e modulação de antibióticos;
- Avaliar a ação inibitória da enzima Acetilcolinesterase;
- Avaliar a toxicidade e o efeito ansiolítico via neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica em Zebrafish adultos;
- Verificar a relação entre as atividades biológicas avaliadas e as respectivas composições presentes nas espécies estudadas.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. Gênero *Lippia* L.

A família Verbenaceae apresenta por volta de 36 gêneros e 1035 espécies. Os gêneros mais representativos em número de espécies são: *Verbena*, *Lippia*, *Citharexylum*, *Stachytarpheta*, *Glandularia* e *Duranta* (JUDD et al., 2008). Esta pertence à ordem Lamiales, enquadrando-se no clado das Asterídes, subclado Asterídes I, um grupo de plantas considerado monofilético (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2016).

Esta é amplamente distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas das Américas, África e Índia, bem como em outras regiões do globo, especialmente em partes mais quentes do mundo. Os centros de maior diversidade são as regiões subtropical e subárida da América do Sul e as cordilheiras do centro do México aos Andes centrais. (ATKINS, 2004; SANDERS, 2001). O Brasil apresenta um relevante centro da diversidade dessa família, onde são conhecidos 16 gêneros e 276 espécies, com 174 endêmicas, 50 consideradas raras, e 27 estão ameaçadas de extinção (CARDOSO et al., 2018).

O gênero *Lippia* é o segundo maior gênero de Verbenaceae e o mais representativo na flora brasileira, reúne cerca de 200 táxons com ampla distribuição na Região Neotropical, nas regiões áridas do sudoeste dos Estados Unidos, florestas tropicais decíduas da América Central e nos campos rupestres e cerrados do Brasil, regiões de altos índices de endemismos (ATKINS, 2004; SALIMENA; MÚLGURA, 2015; SOUSA et al., 2013).

*Lippia* caracteriza-se por apresentar plantas arbustivas ou subarbustivas, com folhas decussadas, geralmente com indumento glandular, florescências parciais capituliformes ou espiciformes, congestas, axilares, brácteas membranáceas ou cartáceas, verdes ou coloridas, amarelas, róseas ou vináceas, ultrapassando ou não o comprimento das flores. Possui flores sésseis, com cálice comprimido, 2-alado, induplicado, membranáceo, inconspícuo, persistente no fruto; corola hipocraterimorfa, alva, rósea, magenta, lilás ou amarelas, tubo reto ou curvo, limbo 4-5 lobado, lábio superior ou adaxial 2-lobado, lábio inferior ou abaxial único, 2 lobos laterais; 4 estames; ovário monocarpelar, bilocular, 2-ovulado, estigma lateral. Fruto dividido na maturidade em dois mericarpos (TRONCOSO, 1974).

Algumas espécies deste gênero, no decorrer dos anos, apresentam problemas de nomenclatura botânica devido à dificuldade na sua identificação correta, acarretando no uso de diferentes sinonímias para uma mesma espécie na literatura, como a *L. alba* (Mill.) N. E. Br., por exemplo, que recebe o nome de *L. geminata microphylla* Griseb, *L. germinata* H.B.K., *L.*

*globiflora* Kuntze, *L. lantanoides* Coult, *Lantana alba* Mill e *Phyla germinata* H.B.K (PASCUAL et al., 2001).

### 3.1.1. Usos tradicionais

As espécies de *Lippia* têm longa história de uso em aplicações medicinais tradicionais, algumas das quais foram validadas cientificamente (OKHALE et al., 2016). A maior compreensão dos seus usos populares no país vem em paralelo ao aumento do interesse científico sobre suas espécies, reproduzido na variedade de estudos que abordam além da composição química das plantas, os seus aspectos botânicos e farmacológicos (SOARES, 2001).

Etnobotanicamente, as espécies deste gênero têm sido utilizadas na América do Sul e Central e na África tropical como alimentos, medicamentos, adoçantes e aromatizantes de bebidas (OKHALE et al., 2016). No nordeste brasileiro, as espécies de *Lippia* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de resfriados, gripes, bronquites e tosse, onde na maioria dos casos, as partes usadas são as folhas e flores na forma de infusão ou decocto, administrados oralmente ou através de emplastos (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011). A Tabela 1 lista os principais usos tradicionais para esse gênero.

Algumas espécies deste gênero, por possuírem atividade comprovada, frente a gama de doenças, estão presentes em algumas unidades de saúde da família do estado do Ceará, sendo aplicadas como fitoterápicos alternativos aos medicamentos convencionais, principalmente por apresentarem menor custo a pacientes oriundos de zonas rurais ou que não possui condições de adquirir medicamentos comerciais (COSTA et al., 2017).

**Tabela 1.** Usos tradicionais de espécies do gênero *Lippia* L.

Espécies	Usos tradicionais
<i>L. abyssinica</i> (Otto & A.Dietr.) Cufod.	Tratamento de distúrbios respiratórios.
<i>L. alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson	Analgésico, anti-inflamatório, antipirético; antiespasmódico; hipotensor; repelente; sedativo; tempero culinário; tratamento de doenças cutâneas, de distúrbios gastrointestinais, de doenças hepáticas e vesiculares, de doenças respiratórias,

	remédio para diarreia, distúrbios menstruais, anemia, sífilis e gonorreia.
<i>L. brasiliensis</i> (Link) T.R.S.Silva	Antiespasmódico.
<i>L. chevalieri</i> Moldenke	Sedativo; antipirético; amebicida; antimalárico; tratamento de doenças respiratórias, gástricas, sífilis e gonorreia.
<i>L. gracilis</i> Schauer	Analgésico; antipirético; cicatrizante; tratamento de doenças cutâneas e respiratórias; miíase.
<i>L. graveolens</i> Kunth	Analgésico, anti-inflamatório, antipirético; tempero culinário; antiespasmódico; abortivo; remédio para diarreia, distúrbios menstruais, diabetes; tratamento de doenças respiratórias.
<i>L. integrifolia</i> (Griseb.) Hieron	Digestivo.
<i>L. javanica</i> (Burm.f.) Spreng.	Analgésico, anti-inflamatório, antipirético; antiespasmódico; tratamento de doenças respiratórias, venéreas, oculares e dérmicas; repelente.
<i>L. kituiensis</i> Vatke	Analgésico; Inseticida; Tratamento de doenças do sistema respiratório e sarampo.
<i>L. micromera</i> Schauer	Tempero culinário; diurético; remédio para distúrbios gastrointestinais e doenças respiratórias.
<i>L. microphylla</i> Cham.	Tratamento de doenças respiratórias; miíase.
<i>L. multiflora</i> Moldenke	Tratamento de doenças hepáticas, vesiculares, respiratórias e desordens do sistema nervoso; anti-hipertensivo; antimalárico; anti-Candida.
<i>L. origanoides</i> Kunth	Tempero culinário; antimalárico; remédio para distúrbios gastrointestinais e doenças respiratórias.
<i>L. plicata</i> Baker	Relaxante muscular; dor de garganta.
<i>L. rehmannii</i> H.Pearson	Alimento; repelente.



<i>L. turbinata</i> Griseb.	Remédio para distúrbios gastrointestinais e reumatismo.
-----------------------------	---

**Fonte:** Adaptado de Pascual et al. (2001) e Camilo et al. (2022).

### 3.1.2. Atividades biológicas e composição química

Em meio aos grupos de plantas investigados pelos pesquisadores na bioprospecção de novas fontes de estudos, o gênero *Lippia* se evidencia com suas espécies aromáticas utilizadas na obtenção de compostos importantes na fabricação de fármacos, cosméticos, herbicidas e inseticidas (SOUSA, 2008). Dentre as principais atividades farmacológicas relatadas na literatura, destacam-se: antimicrobiana, anti-inflamatória, repelente de insetos, antipirético e anestésico, observadas em diferentes espécies do gênero. A Tabela 2 lista as atividades biológicas demonstradas em diversos estudos.

**Tabela 2.** Atividades biológicas das espécies do gênero *Lippia* L.

Espécie	Parte da planta	Extrato	Atividade biológica	Autor
<i>L. adoensis</i> Hochst.	Folhas	Óleo essencial	Antioxidante	(FIKADU; YAYA; CHANDRAVA NSHI, 2022)
	Folhas	Extratos metanólico e aquoso.	Antioxidante	(SASIKUMAR; ERBA; EGIGU, 2020)
<i>L. alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson	Folhas	Óleo essencial	Repelente	(LIMA et al., 2016; MOTA et al., 2022)
	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana	(GODOY et al., 2020; POSSAMAI et al., 2019)
	Folhas	Óleo essencial	Citotoxicidade	(MIURA et al., 2021)

	Folhas	Óleo essencial	Anestésico	(KAMPKE et al., 2018; SOUZA et al., 2017a)
	Folhas	Óleo essencial	Quimiopreventivo	(MONTERO-VILLEGAS et al., 2018)
	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica	(FONTANA et al., 2021; GEROMINI et al., 2015)
	Folhas	Extrato aquoso	Anti-AChE	(JESUS et al., 2019)
	Folhas	Óleo essencial	Ansiolítica	(ALVARADO-GARCÍA et al., 2021)
	Folhas	Extrato etanólico e frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica.	Antioxidante e antibacteriana.	(OLIVEIRA et al., 2018)
	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana e antibiofilme.	(BATISTA et al., 2018)
	Folhas	Óleo essencial	Antioxidante	(NONATO et al., 2022)
	Folhas	Óleo essencial	Inseticida	(ALVES et al., 2015)
	Folhas e inflorescências	Óleos essencial	Hemolítica e anti-AChE.	(MUÑOZ-ACEVEDO et al., 2019)
	Folhas e inflorescências	Óleo essencial	Antibacteriana	(MAJOLO et al., 2017)
	Folhas secas	Óleo essencial	Anti-helmíntica	(GOMES et al., 2022)

	Partes aéreas	Hidrolato	Anestésico	(MAIA et al., 2019)
	Partes aéreas	Óleo essencial	Antioxidante	(JOSHI et al., 2018)
	Partes aéreas	Extrato etanólico	Alelopática	(OLIVEIRA et al., 2019b)
	Partes aéreas	Óleo essencial	Antibacteriana e antibiofilme.	(PORFÍRIO et al., 2017)
<i>L. gracilis</i> Schauer	Brotos	Óleo essencial	Antibacteriana	(SILVA et al., 2019a)
	Folhas	Óleo essencial	Antioxidante	(NONATO et al., 2022)
	Folhas	Óleo essencial	Citotoxicidade	(MIURA et al., 2021)
	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana	(CARDOSO-JÚNIOR et al., 2021)
	Folhas	Óleo essencial	Larvicida	(DIAS et al., 2015)
	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica e antibiofilme.	(OLIVEIRA et al., 2020b)
	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana e antibiofilme.	(SILVA et al., 2022)
	Folhas	Óleo essencial	Repelente e inseticida.	(SANTOS et al., 2019)
	Folhas	Óleo essencial	Inseticida	(MONTEIRO et al., 2021a; OLIVEIRA et al., 2020a)
	Folhas e inflorescência	Óleo essencial	Anti-helmíntica	(OLIVEIRA et al., 2021)
	Folhas secas	Óleo essencial	Anti-helmíntica	(GOMES et al., 2022)

	Folhas secas	Óleo essencial	Carrapaticida	(PENHA et al., 2021)
	Folhas secas	Óleo essencial	Acaricida e repelente.	(TEODORO et al., 2021)
	Folhas secas	Óleos essencial	Larvicida	(GALVÃO et al., 2019)
<i>L. grata</i> Schauer	Folhas	Óleo essencial	Antioxidante	(SIQUEIRA-LIMA et al., 2017)
	Folhas	Óleo essencial	Larvicida, anti-AChE, anti-fosfatase, anti-amilase e anti-esterase.	(FELIX et al., 2021)
	Folhas e inflorescências secas	Óleos essencial	Anti-helmíntica	(BARRIGA et al., 2020)
<i>L. graveolens</i> Kunth	Folhas	Extratos hexânico, acetato de etila, metanólico e aquoso.	Ansiolítica	(GONZÁLEZ-TRUJANO et al., 2017)
	Folhas	Extrato metanólico	Antioxidante	(GUTIÉRREZ-GRIJALVA et al., 2017)
	Folhas	Extrato hexânico	Inseticida	(GUEVARA et al., 2018)
	Folhas	Extratos metanólico e clorofórmico	Anti-inflamatória	(LEYVA-LÓPEZ et al., 2016)
	Partes aéreas	Extrato hidroalcoólico	Antioxidante	(CORTÉS-CHITALA et al., 2021)

	Ramos	Óleo essencial	Antifúngica e pesticida.	(MEDINA-ROMERO et al., 2021)
<i>L. hirta</i> (Cham.) Meisn. ex Walp.	Partes aéreas	Óleo essencial	Antioxidante e anti-AChE.	(OLIVEIRA et al., 2019a)
	Partes aéreas	Extrato aquoso	Antioxidante e antiAChE	(OLIVEIRA et al., 2019a)
<i>L. integrifolia</i> (Griseb.) Hieron.	Partes aéreas	Óleo essencial	Antioxidante	(BARBIERI et al., 2016)
	Partes aéreas	Óleos essencial	Antifúngica	(LEAL et al., 2018)
<i>L. javanica</i> (Burm.f.) Spreng.	Folhas	Extrato aquoso	Antioxidante	(BHEBHE; CHIPURURA; MUCHUWETI, 2015)
	Folhas	Extrato metanólico	Larvicida	(PHAMBALA et al., 2020)
	Folhas	Óleo essencial	Inseticida	(KAMANULA et al., 2017)
	Folhas	Óleo essencial	Antimicrobiana	(ENDRIS; ASFAW; BISRAT, 2015)
<i>L. lacunosa</i> Mart. & Schauer	Partes aéreas	Óleo essencial	Antifúngica	(MEDEIROS et al., 2016)
<i>L. macrophylla</i> Cham.	Folhas	Óleo essencial	Tripanocida	(SOUZA et al., 2017b)
<i>L. micromera</i> Schauer	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana	(BUGAYONG; CRUZ; PADILLA, 2019)

<i>L. microphylla</i> Cham.	Folhas	Óleo essencial	Tocolítica	(SILVA et al., 2021a)
	Folhas	Extrato etanólico	Antioxidante e fotoprotetora.	(NUNES et al., 2018)
	Partes aéreas	Óleo essencial	Antitumoral	(XAVIER et al., 2015)
<i>L. multiflora</i> Moldenke	Folhas	Óleo essencial	Antioxidante, inseticida, anti-AChE, anti-BChE e anti-tirosinase.	(KOBENAN et al., 2022)
	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica	(ETIENNE; MOHAMED; CHRISTIANE, 2020)
	Folhas	Óleo essencial	Antioxidante, antiviral, anti-AChE, anti-BChE e anti-amilase.	(JOSÉ-RITA et al., 2022)
	Folhas	Óleo essencial	Anti-inflamatória	(SORO et al., 2016)
	Folhas e caules	Extrato aquoso	Ansiolítica	(NGAIBI et al., 2021)
	Parte aéreas	Óleo essencial	Inseticida	(ILBOUDO et al., 2015)
	Partes aéreas	Óleo essencial	Antibacteriana	(SAMBA et al., 2020)
<i>L. origanoides</i> Kunth	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana	(RIBEIRO et al., 2021)
	Folhas	Óleo essencial	Antisséptica e antibacteriana	(ALMEIDA et al., 2016)
	Folhas	Óleo essencial	Antimicrobiana	(HERNANDES et al., 2017; SARRAZIN et al., 2015)

	Folhas	Óleo essencial	Alelopática	(SOUSA et al., 2020)
	Folhas	Óleos essencial	Tocolítica	(MACÊDO et al., 2022)
	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica	(MEDEIROS et al., 2016)
	Folhas	Óleo essencial	Antioxidante, acaricida, anti-AChE e inseticida.	(MAR et al., 2018)
	Folhas	Extrato etanólico	Inseticida	(FLORES et al., 2017)
	Folhas e inflorescência	Óleo essencial	Anti-helmíntica	(OLIVEIRA et al., 2021)
	Folhas e inflorescências	Óleo essencial	Antibacteriana	(MAJOLO et al., 2017)
	Partes aéreas	Óleo essencial	Antimicrobiana	(PERERA et al., 2016)
	Partes aéreas	Óleo essencial	Antioxidante e anti-tirosinase.	(SILVA et al., 2017)
	Planta inteira	Óleo essencial	Antibacteriana, anti-biofilme e anti-Quorum.	(CÁCERES et al., 2020)
<i>L. palmeri</i> S.Watson	Folhas	Extrato metanólico	Antioxidante	(GUTIÉRREZ-GRIJALVA et al., 2017)
	Folhas	Hidrolato	Antibacteriana	(GARCÍA-ROMO et al., 2018)
	Folhas	Extratos metanólico e clorofórmico	Anti-inflamatória	(LEYVA-LÓPEZ et al., 2016)
<i>L. rigida</i> Schauer	Folhas	Óleo essencial	Larvicida e anticâncer	(OLIVEIRA et al., 2016)

<i>L. rubella</i> (Moldenke) T.R.S.Silva & Salimena	Partes aéreas	Extrato etanólico e frações hexânico, diclorometano, acetato de etila e n-butanol.	Antifúngica	(MARTINS et al., 2019)
<i>L. scaberrima</i> Sond.	Partes aéreas	Óleo essencial	Antimicobacteriana e hepatoprotetora.	(REID; OOSTHUIZEN; LALL, 2020)
	Partes aéreas	Extrato etanólico	Antimicobacteriana, antiproliferativa e inibitória da COX-II.	(REID; OOSTHUIZEN; LALL, 2020)
<i>L. schaueriana</i> Mart. ex Schauer	Folhas	Óleo essencial	Inseticida	(OLIVEIRA et al., 2020a)
<i>L. sidoides</i> Cham	Folhas	Óleo essencial	Antioxidante	(GARMUS et al., 2015; NONATO et al., 2022)
	Folhas	Óleo essencial	Citotoxicidade	(MIURA et al., 2021)
	Folhas	Óleo essencial	Anti-Candida	(BRITO et al., 2015)
	Folhas	Óleo essencial	Inseticida e repelente	(BACCI et al., 2015)
	Folhas	Óleos essencial	Antibacteriana e modulador de antibióticos	(VERAS et al., 2017)
	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica	(ZILLO et al., 2018)
	Folhas	Óleos essencial	Antifúngico	(OLIVEIRA et al., 2019a, 2019b)



	Folhas	Óleos essencial	Antimicobacteriana	(MOTA; DANTAS; FROTA, 2018)
	Folhas	Óleo essencial, extrato etanólico e frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e fração aquosa.	Antimicrobiana, anti-inflamatória e antinoceptiva.	(MORAIS et al., 2016)
	Folhas	Óleo essencial	Inseticida	(FIGUEIREDO et al., 2017)
	Folhas	Extratos aquoso e etanólico	Modula proteases, fosfolipases, $\alpha$ -amilase, $\alpha$ -glicosidase, lipase e tripsina.	(BRAGA et al., 2019)
	Folhas e galhos	Óleo essencial	Antibacteriana	(VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2018)
	Folhas e inflorescência	Óleo essencial	Acaricida	(SANTANA et al., 2021)
	Folhas e inflorescências	Óleo essencial	Antibacteriana	(MAJOLO et al., 2017)
	Folhas secas	Óleo essencial	Carrapaticida	(PENHA et al., 2021)
	Folhas secas	Óleo essencial	Antibacteriana	(MONTEIRO et al., 2021)
	Partes aéreas	Óleo essencial	Antidepressiva	(PARENTE et al., 2018)
	Partes aéreas	Extrato etanólico	Inibidora da fosfodiesterase	(RAJGOPAL et al., 2015)
<i>L. thymoides</i> Mart. & Schauer	Folhas	Óleo essencial	Repelente	(BRITO et al., 2021; MOTA et al., 2022)

	Folhas	Óleo essencial	Antioxidante	(NASCIMENTO et al., 2021)
	Folhas	Óleo essencial	Anti-AChE	(SILVA et al., 2019)
	Folhas e caules	Extrato metanólico e frações hexânica, diclorometano e acetato de etila.	Antioxidante, antimicrobiana e antipirético.	(SILVA et al., 2015)
	Folhas secas	Óleo essencial	Antibacteriana e relaxante muscular.	(SILVA et al., 2016)
	Folhas secas	Óleo essencial	Antimicrobiana	(SILVA et al., 2021)
<i>L. turbinata</i> Griseb.	Partes aéreas	Óleo essencial	Antioxidante	(BARBIERI et al., 2016)

Devido a maioria das espécies desse gênero serem aromáticas, os estudos químicos e farmacológicos se concentram, principalmente, na utilização dos seus óleos essenciais, todavia sua composição não-volátil se constitui de compostos importantes como flavonoides, naftoquinonas e iridóides glicosílicos (FUNARI et al., 2012).

Nos estudos que relatam a composição química volátil das espécies de *Lippia*, observa-se que, geralmente, estas apresentam variações nos teores de óleos essenciais, onde os componentes comumente encontrados nesses óleos são monoterpenos, como limoneno, *p*-cimeno, linalol, cânfora, timol e  $\alpha$ -pineno, e o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011; PASCUAL et al., 2001). O Apêndice 1 descreve a composição desses óleos.

Quanto aos compostos fenólicos existem poucos relatos, onde a maioria dos flavonoides encontrados nestas espécies são flavonas, especialmente as 6-hidroxi-flavonas, metoxiflavonas e alguns sulfatos de flavonas (mono e disulfatos), mas estes foram estudados e identificados apenas em algumas espécies. As naftoquinonas identificadas em *Lippia* foram o lapachenol, o isocatalponol, o 6-oxo-3,4,4a,5-tetrahydro-3-hidroxi-2,2-dimetilnafto-1,2-pirano e a lippidoquinona. Além destes, existem relatos de alcaloides, taninos, saponinas e iridóides encontrados em algumas espécies, mas sem relação classificativa comum entre estas (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011; PASCUAL et al., 2001). O Apêndice 2 mostra os compostos não-voláteis relatados no gênero *Lippia*.

### 3.2. Espécies reativas e estresse oxidativo

As espécies reativas são átomos, moléculas ou íons, que possuem alta reatividade e constituem três categorias diferentes: espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de enxofre (EREs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que ainda podem ser divididas em dois grupos: os radicais livres e os compostos não radicalares. O primeiro grupo é classificado como átomos ou moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos, o que permite a transferência de elétrons com moléculas vizinhas, criando alterações no ambiente molecular ao seu redor, como  $\text{OH}^\bullet$  (íon hidroxila),  $\text{HOH}^\bullet$  (íon peroxil),  $^\bullet\text{O}_2^-$  (ânion superóxido), NO (óxido nítrico) e  $\text{O}_2$  (oxigênio molecular). O segundo grupo, como  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrogênio) e HOCl (ácido hipocloroso), não possuem elétrons livres, sendo, portanto, menos instáveis que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas em ambientes próximos (MARTELLI; NUNES, 2014).

A produção de espécies reativas é parte integrante do metabolismo e está presente em condições normais, especialmente nos processos fisiológicos envolvidos na produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intracelular e síntese de substâncias importantes, tais como hormônios e enzimas (VASCONCELOS et al., 2014). No entanto, a formação endógena exacerbada pode ser causada pela ativação aumentada de fagócitos, pela interrupção dos processos normais de transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, pelo aumento da concentração de íons metálicos de transição por escape do grupamento heme de proteínas em locais de lesão ou doenças metabólicas e por níveis diminuídos das defesas antioxidantes (FILIPPIN et al., 2008).

Além disso, fatores exógenos podem estar relacionados a formação dessas espécies reativas, como poluição ambiental, resíduos de pesticidas, substâncias presentes em alimentos e bebidas (aditivos químicos, hormônios, entre outros), Raio-x, radiação ultravioleta e radiação gama, estresse, dentre outros (VASCONCELOS et al., 2014).

Contudo, o organismo humano detém um sistema antioxidante para neutralizar e eliminar essas espécies reativas em excesso, impedindo seus efeitos nocivos. O sistema antioxidante endógeno é formado principalmente por enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona oxidase (GO), glutatona redutase (GR) e peroxirredoxinas (Prxs), que agem catalisando direta ou indiretamente as espécies reativas para proteger as células; e por antioxidantes não enzimáticos, como a ceruloplasmina, ferritina, transferrina, melatonina, glutatona, lactoferrina, ácido úrico, bilirrubina e poliaminas, que neutralizam o efeito oxidativo promovendo uma enzima

antioxidante ou processando diretamente a reação em cadeia oxidativa (HE et al., 2017; MENDES; PEREIRA; ANGELIS-PEREIRA, 2020).

Em circunstâncias normais, existe equilíbrio entre a produção de espécies reativas e sua neutralização pelos sistemas antioxidantes endógenos, porém quando ocorre produção excessiva desses compostos ou deficiências dos sistemas antioxidantes, surge o quadro denominado de estresse oxidativo, ocorrendo procura por estabilidade dessas espécies através do emparelhamento de elétrons com macromoléculas biológicas em células saudáveis. Este quadro causa uma série de lesões celulares por meio de peroxidação dos lipídeos de membrana, oxidação de receptores hormonais e enzimas, e lesões no material genético, como oxidações de bases do DNA que podem culminar em processos mutagênicos e tumorais (KUMAR; PANDEY, 2015; MARTELLI; NUNES, 2014).

### **3.3. Antioxidantes naturais**

Há tendência em substituir os antioxidantes sintéticos utilizados na indústria alimentícia por antioxidantes naturais, devido os primeiros apresentarem toxicidade ao longo do tempo, podendo causar alergias cutâneas, problemas do trato gastrointestinal, aumento do risco de câncer, danos ao DNA e induzir a senescência prematura (LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

Em conjunto com as defesas antioxidantes endógenas, os compostos antioxidantes ingeridos na alimentação trabalham para evitar a sobrecarga de espécies reativas no organismo (MENDES; PEREIRA; ANGELIS-PEREIRA, 2020). Estes antioxidantes exógenos são provenientes principalmente de alimentos e plantas medicinais, como frutas, vegetais, cereais, cogumelos, bebidas, flores, especiarias e ervas medicinais tradicionais (XU et al., 2017). Estes compostos antioxidantes, como vitaminas, minerais, compostos fenólicos e carotenoides, atuam tanto sobre as espécies reativas quanto estimulando os sistemas de defesa endógena (CÂNDIDO; SILVA; AGOSTINI-COSTA, 2015).

Os minerais, como selênio, magnésio, manganês, zinco, cobre e ferro, apesar de não atuarem diretamente como antioxidantes, agem como cofatores essenciais para enzimas do sistema endógeno, sendo o zinco, cobre e manganês necessários para superóxido dismutases tanto no citosol quanto na mitocôndria, o selênio e o magnésio são componentes essenciais das glutathione peroxidases e o ferro é um constituinte da catalase, que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio (AMORIM; TIRAPEGUI, 2008; LANDETE, 2013; MENDES; PEREIRA; ANGELIS-PEREIRA, 2020).

O ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, está envolvido na primeira linha de defesa antioxidante, protegendo as membranas lipídicas e as proteínas do dano oxidativo, além de ser eficaz na regeneração da forma antioxidante da vitamina E, pela redução dos radicais tocoferoxila. Ele apresenta 4 grupos –OH, distribuídos em dois pares em átomos de carbono adjacentes, sendo assim capaz de quelar íons metálicos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e de eliminar o óxido de nitrogênio e espécies reativas de oxigênio, como o íon radical superóxido, o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila e o oxigênio singlete, atuando como agente redutor (BREWER, 2011; PEHLIVAN, 2017).

Vitamina E é um antioxidante lipossolúvel e termo comum para o grupo dos tocoferóis e tocotrienóis ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -), dos quais  $\alpha$ -tocoferol tem a maior atividade biológica (LANDETE, 2013). Ela funciona como quebra de cadeia durante a peroxidação lipídica nas membranas celulares e várias partículas lipídicas, incluindo lipoproteína de baixa densidade (LDL), interceptando os radicais peróxido lipídico ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ) e encerrando as reações em cadeia da peroxidação lipídica (NIMSE; PAL, 2015).

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis responsáveis pela cores vermelha, laranja, rosa e amarela de diversas frutas e vegetais, onde  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina são os seis carotenoides mais abundantes encontrados no plasma sanguíneo, sendo os três primeiros responsáveis pela atividade pró-vitamina A. (ELVIRATORALES; GARCÍA-ALONSO; PERIAGO-CASTÓN, 2019). Estes compostos atuam como antioxidantes através de oxidação, redução, abstração do átomo de H e reações de adição, tendo efetividade contra oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical de óxido nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) e ânion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (RIBEIRO et al., 2018).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está diretamente ligada à sua estrutura onde o número de grupos hidroxila e sua posição em relação ao grupo funcional carboxila influenciam nesta atividade (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JUNIOR, 2019). Estes compostos atuam como antioxidantes primários pela transferência de átomo de hidrogênio (HAT) ou transferência de elétron único (SET), transferência de elétron-perda de próton sequencial (SPLET) e formação de aduto radical (RAF), bem como promovem a quelagem de íons metálicos como o ferro e o cobre (ALOV; TSAKOVSKA; PAJEVA, 2015; AMAROWICZ; PEGG, 2019).

Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides se destacam quanto a atividade antioxidante. São uma classe de compostos amplamente encontrados em frutas, vegetais e classificados de acordo com a oxidação e saturação expressa na estrutura heterocíclica do anel C (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). A ação antioxidante dos flavonoides inclui extinguir os radicais livres por doação de elétrons ou transferência de átomos de H, quelagem

de metais, suprimir as enzimas associadas à geração de radicais livres e estimular as enzimas antioxidantes internas (BANJARNAHOR; ARTANTI, 2014).

### 3.4. Óleos essenciais

Óleos essenciais (OE) são definidos pela Organização Internacional de Padronização (ISO) como produto obtido a partir de matéria-prima natural de origem vegetal, por destilação a vapor, por processos mecânicos ou por destilação a seco (GROOT, 2020). Estes são caracterizados por ser uma mistura de metabólitos secundários voláteis que desempenham papéis importantes na defesa vegetal, contra estresses bióticos e abióticos e em processos de sinalização, envolvendo também a atração de polinizadores e insetos benéficos (CAMPOLO et al., 2018).

Os OE são produzidos em diferentes órgãos vegetais como flores, ervas, brotos, folhas, frutos, galhos, cascas, sementes, madeira, rizomas e raízes e podem ser armazenados em estruturas específicas, como tricomas glandulares, cavidades secretoras e dutos de resina (CAMPOLO et al., 2018). Compostos químicos distintos são detectados em OE, indo desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre, onde a maioria dos componentes apresentam estrutura terpenoide ou fenilpropanoide (SIMÕES et al., 2017).

Os fenilpropanoides compreendem classes estruturais com funções biológicas distintas envolvidas na defesa, sobrevivência e suporte estrutural associado ao desenvolvimento vegetal, tendo sua biossíntese regulada por diversos estímulos ambientais. O metabolismo dos fenilpropanoides está centralizado no metabolismo aromático geral das plantas, partindo do chiquimato e da fenilalanina à polímeros de lignina, cumarinas, fenólicos voláteis e taninos hidrolisáveis (ROCK, 2017).

Os terpenos são um grupo de substâncias vegetais variáveis, cuja estrutura deriva do isopreno, que, após a ligação com radicais fosfato, origina as duas unidades de C5 básicas, o difosfato de isopentenila (IPP) e o difosfato de dimetilalila (DMAPP). Estas sofrem condensação, originando hidrocarbonetos acíclicos, que se dobram de diferentes maneiras dando origem as classes de terpenos, que apresentam carbonos múltiplos de cinco. Monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15) são mais frequentemente encontrados em OE, enquanto que os diterpenos (C20), principalmente quando oxigenados, aparecem apenas em óleos extraídos com solventes orgânicos e por fluido supercrítico (SIMÕES et al., 2017).

A composição volátil de uma espécie é estabelecida geneticamente, podendo ser específica de um órgão e característica de um estágio de desenvolvimento, porém as condições ambientais no qual está inserida são capazes de causar variações significativas, fazendo com que indivíduos botanicamente idênticos difiram na sua composição química (SIMÕES et al., 2017). Assim, o estudo da variabilidade química e a determinação dos quimiotipos de OE são de essencial importância, pois podem determinar diferentes bioatividades e níveis de toxicidade. Além disso, é importante salientar que compostos menores desempenham papel importante no polimorfismo químico de uma espécie, já que as atividades biológicas de um OE podem se dar pela ação sinérgica da composição minoritária (ZOUARI, 2013).

Os OE detêm vasto campo de aplicações, sendo seus maiores compradores as indústrias de aromas e fragrâncias, seguidos pela indústria de alimentos, onde OE e seus derivados são adicionados a uma série de produtos, incluindo bebidas não alcoólicas e alcoólicas e alimentos para fins aromatizantes. Outras aplicações importantes se dão em perfumes, produtos domésticos, como detergentes, amaciantes, produtos de limpeza e outras mercadorias de consumo, incluindo aromas de ambiente, velas, incenso e produtos cosméticos (GROOT; SCHMIDT, 2016). Além disso, apresentam diversas propriedades biológicas, como anticâncer, anti-inflamatória, antidiabética, antiulcerogênica, antidepressiva, ansiolítica, incluindo potenciais antioxidantes e antimicrobianas (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

Diversos trabalhos demonstraram que as propriedades antioxidantes dos óleos essenciais depende de sua composição, estando bem estabelecido que os compostos fenólicos e os metabólitos secundários com ligações duplas conjugadas geralmente apresentam ação antioxidante substancial (DHIFI et al., 2016). Para a atividade antimicrobiana, sua principal característica é hidrofobicidade, que permite que os OE dividam os lipídios da membrana celular bacteriana, sendo rompida e deixada mais permeável. Usualmente, os compostos fenólicos são responsabilizados por sua atividade antibacteriana, por provocarem coagulação do conteúdo celular e interrupção da membrana citoplasmática, fluxo de elétrons, força motriz do próton e transporte ativo (HANIF et al., 2019). Além deles, os álcoois terpênicos, cetonas e ésteres também determinam esta atividade (DHIFI et al., 2016).

### **3.5. Resistência de microrganismos**

A resistência antimicrobiana aos antibióticos (RMA) é um dos problemas de saúde pública mais relevante da atualidade, devido as bactérias que antes mostravam-se suscetíveis aos antibióticos utilizados deixaram de respondê-los. O desenvolvimento deste quadro é resultante da pressão seletiva praticada pelo uso de antibióticos, porém tem se agravado

rapidamente devido ao uso inadequado desses fármacos, acabando por existir uma correlação entre o consumo exacerbado e os níveis elevados de resistência (LOUREIRO et al., 2016).

Além disso, a RMA pode estar associada a outros fatores incluindo práticas de prescrição e educação do paciente inadequadas, instalações de diagnóstico limitadas, venda não autorizada de antimicrobianos, falta de mecanismos reguladores de drogas funcionando adequadamente e uso não humano de antimicrobianos, como na produção animal (AYUKEKBONG; NTEMGWA; ATABE, 2017).

Os mecanismos que promovem a RMA podem ser classificados em resistência intrínseca, que está ligada a características estruturais e/ou funcionais exclusivas de determinadas bactérias, como alguns grupos de bactérias que normalmente não têm um local-alvo para o antibiótico específico, tornando-os ineficazes; e como resistência adquirida, na qual as bactérias suscetíveis desenvolvem resistência contra certos antibióticos ao receber códigos genéticos de outras cepas bacterianas (ABUSHAHEEN et al., 2020).

A resistência adquirida pode se dar por três mecanismos principais como a modificação de enzimas ou inativação de agentes antimicrobianos, pelo acúmulo intracelular reduzido de antimicrobianos pelo influxo reduzido ou o efluxo intensificado, pelas alterações nos locais-alvo e pela disseminação de genes de resistência (ABUSHAHEEN et al., 2020), incluindo mecanismo de conjugação/mobilização (realizada por plasmídeos e elementos conjugativos integrativos), transdução (realizada por bacteriófagos) e transformação (absorção de DNA extracelular) (PARTRIDGE et al., 2018).

Diante disso, algumas abordagens foram desenvolvidas para combater a RMA, se dividindo em duas áreas principais: a primeira, prioritariamente, é o reconhecimento preciso de alvos moleculares que não se dispõem a mecanismos de resistência de desenvolvimento rápido; e a segunda, é a necessidade imediata de superar os cinco mecanismos principais de ação antimicrobiana (síntese da parede celular e de proteínas, RNA polimerase e DNA girase, mecanismo de folato e estrutura da membrana), como o incremento de moléculas que barrem o desenvolvimento de resistência por efluxo e alteração do alvo molecular apresentado por bactérias Gram-negativas (DHINGRA et al., 2020).

Na direção de novos antimicrobianos, a triagem vegetal como fonte alternativa é realizada em todo o mundo, onde suas propriedades antimicrobianas estão ligadas a presença de compostos ativos como quinonas, fenóis, alcaloides, flavonoides, terpenoides, óleo essencial, taninos, lignanas, glucosinolatos, bem como os peptídeos que formam seus sistemas de defesa análogos em estrutura e função aos peptídeos antimicrobianos (CHANDRA et al., 2017).



A célula microbiana é afetada por metabólitos secundários de diversas maneiras, incluindo a perturbação das funções e estrutura da membrana celular, interferência com o metabolismo intermediário, interrupção da síntese e função de DNA/RNA e da comunicação celular normal e pela indução da coagulação de constituintes citoplasmáticos. Além disso, a combinação da terapia de antibióticos padrões com extratos de plantas que possuem atividade sinérgica bactericida, pode ser utilizada para expansão do espectro antimicrobiano, prevenção da emergência de mutantes resistentes a medicamentos e minimizar o nível de toxicidade dos antimicrobianos convencionais (ANAND et al., 2019).

### **3.6. Transtornos de ansiedade**

A ansiedade é um transtorno psiquiátrico comum associado ao medo, nervosismo, apreensão e pânico, podendo envolver ainda os sistemas cardiovascular, respiratório, gastrointestinal ou nervoso, individualmente ou combinados (MARTIN, 2003). Este, incluindo transtorno de pânico com ou sem agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade social, fobias e transtorno de ansiedade de separação, são os transtornos mais predominantes, atingindo 3,6% da população mundial e 9,3% dos brasileiros, sendo o Brasil o país com maior índice desse transtorno nas Américas (BANDELOW; MICHAELIS, 2015; WHO, 2017).

Biologicamente, a ansiedade pode ocorrer por três principais aspectos: o primeiro são alterações neuroanômicas nas regiões cerebrais que modulam as emoções, especialmente as amígdalas (condicionamento e resposta ao medo), o hipocampo (processamento do contexto) e córtex pré-frontal (modulação do medo e suas respostas de extinção); o segundo são os neurotransmissores, como o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), noradrenalina e serotonina, que regulam a ansiedade por neuroquímica através do sistema límbico; e o terceiro são as anormalidades no funcionamento e ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA), componente importante na resposta neuroendócrina ao estresse (LIMA et al., 2020).

Além destes, a ansiedade também pode decorrer de fatores genéticos e ambientais. Quanto aos fatores genéticos, estudos tem apontado para uma herança ligada a múltiplos genes candidatos, especialmente aos genes relacionados à função monoaminérgica, neuropeptídeos ou sistemas relacionados ao eixo HPA, fornecendo evidências de associações entre variantes no gene da monoaminoxidase A (MAOA), o gene catecol-*O*-metiltransferase (COMT), o gene do receptor de serotonina 1A (5-HT<sub>1A</sub>), o gene do receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (ADORA<sub>2A</sub>), o gene do receptor de neuropeptídeo S (NPSR1) ou o gene do receptor de hormônio liberador de corticotropina 1 (CRHR1) (SCHIELE; DOMSCHKE, 2018).

Já os fatores ambientais estão ligados a experiências psicossociais estressantes e traumáticas como abusos e negligências emocional e/ou física, violência sexual, doenças crônicas, lesões traumáticas, luto, divórcio, dificuldades financeiras, dentre outros (SCHIELE; DOMSCHKE, 2018; STRÖHLE; GENSICHEN; DOMSCHKE, 2018).

Por outro lado, estudos em roedores vem demonstrando que a hiperativação do sistema colinérgico desempenha um papel na causa de sintomas de ansiedade e depressão, onde níveis altos de acetilcolina (ACh) no sistema nervoso central promovem comportamentos similares a estas patologias em roedores e humanos. Assim, de acordo com esta hipótese, a redução da expressão da acetilcolinesterase (AChE), principal enzima degradativa da ACh, no cérebro pode estar subjacente ao aumento do comportamento ansioso e depressivo, sendo a pesquisa voltada para a ACh uma esperança para terapias medicamentosas mais eficazes no tratamento destes transtornos (MCCLOSKEY; YOUNG; ANDERSON, 2017).

Atualmente, os benzodiazepínicos (BZD) e os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) são os medicamentos mais eficazes no controle dos sintomas de ansiedade (BENNEH et al., 2017). Os BZD atuam como moduladores alostéricos positivos em receptores GABA<sub>A</sub>, exibindo também propriedades amnésicas, anticonvulsivantes, sedativas e relaxantes musculares, tendo seu uso crônico provocado tolerância e efeitos colaterais consideráveis (GRIESSNER et al., 2021; VOSSSEN et al., 2020). Já os ISRS, apresentam melhor relação benefício versus risco do que qualquer outro medicamento utilizado da farmacoterapia atual, porém, ainda assim, seus efeitos colaterais incluem nervosismo no início da terapia, embotamento emocional, problemas gastrointestinais, insônia, disfunção sexual e risco aumentado de ideação suicida (SARTORI; SINGEWALD, 2019).

Devido aos efeitos colaterais apresentados, a busca por novos compostos com atividade ansiolítica e antidepressiva se faz necessária (LÓPEZ-RUBALCAVA; ESTRADA-CAMARENA, 2016). Estudos retratam a ação ansiolítica de fitoquímicos dietéticos como terpenos, alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos, saponinas, lignanas, cinamatos e de diferentes extratos vegetais em uma gama de modelos animais, mostrando a interação destes com os receptores GABA<sub>A</sub> em sítios BZD e não-BZD, receptores serotoninérgicos 5-HT, sistemas noradrenérgico e dopaminérgico, receptores de glutamato e canabinoides. Sendo importante ressaltar que a administração destes a longo prazo não está associada a efeitos adversos clinicamente graves em humanos (FEDOTOVA et al., 2017).

### **3.7. Quimiometria**

Análise multivariada se refere a todas as técnicas estatísticas que analisam múltiplas medidas sobre indivíduos ou objetos sob investigação ao mesmo tempo, desse modo, qualquer análise simultânea de mais do que duas variáveis podem ser classificadas, a princípio, como multivariada. Esta é caracterizada por um conjunto de técnicas para análise de dados que está sempre em desenvolvimento e que abrange uma vasta esfera de possíveis situações de pesquisa (HAIR et al., 2009).

Os métodos utilizados para análise multivariada podem ser classificados em três categorias com base em seus objetivos. Na primeira categoria se encaixam os métodos correlacionais que revelam as variâncias ou covariâncias das variáveis observadas por meio de suas associações de um ao outro, incluindo a correlação canônica, análise de regressão, análise de componente principal, análise de fator e modelagem de equação estrutural. A segunda categoria junta os métodos de diferença que avaliam as variáveis com base em suas diferenças entre os grupos, incluindo a família ANOVA, regressão logística, análise discriminante e análise conjunta. Já a terceira, agrupa os métodos de distância ou similaridade que localizam itens de interesse em relação uns aos outros, representados por análise de cluster, escalonamento multidimensional e análise de correspondência (MCQUITTY, 2018).

A análise de dados multivariados é ferramenta poderosa para analisar e estruturar conjuntos de dados obtidos em processos químicos, como na análise de misturas complexas, na síntese de compostos com as propriedades desejadas e na construção e operacionalização de tecnologias químicas (VARMUZA; FILZMOSER, 2009). Assim, quimiometria é definida como a disciplina química que utiliza matemática, estatística e outros métodos derivados que usam lógica formal para projetar ou selecionar procedimentos e experimentos de medição de ideais e fornecer o maior número de informações químicas relevantes por meio da análise de dados (AMIGO, 2021).

Além do planejamento experimental, a estatística multivariada aplicada à química é usada no processamento dos dados analíticos, abrangendo projetos de experimentos *upstream* e análises de dados para obtenção dos resultados após a realização de testes. A necessidade dessas ferramentas quimiométricas vem de encontro ao desenvolvimento de instrumentos analíticos que fornecem grandes quantidades de dados cada vez mais complexos (CORREIA; FERREIRA, 2007; ROUSSEL et al., 2014), como cromatografia hífenizada e espectroscopia como detecção de matriz de diodo de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC-DAD), análise de espectro de massa de cromatografia gasosa (GC-MS), detecção de matriz de diodo de eletroforese capilar (CE-DAD), HPLC-MS e HPLC-ressonância magnética nuclear (NMR) (BANSAL et al., 2014).

Essa parte da quimiometria desenvolve ferramentas computacionais que permitem explorar os dados obtidos por meio de análises químicas, verificando se há similaridade entre as amostras que, por sua vez, vão corresponder à composição química (CORREIA; FERREIRA, 2007). Além disso, análises quimiométricas podem ser utilizadas para obter dados precisos sobre a correlação entre a composição química de uma espécie e suas atividades biológicas (GREGÓRIO; OLIVEIRA, 2021).

## REFERÊNCIAS

- ABUSHAHEEN, M. A. et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, p. 100971, 2020. DOI: 10.1016/j.disamonth.2020.100971.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007. DOI: 10.1016/j.jep.2007.08.017.
- ALBUQUERQUE, U. P.; RAMOS, M. A.; MELO, J. G. New strategies for drug discovery in tropical forests based on ethnobotanical and chemical ecological studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 197–201, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2011.12.042.
- ALMEIDA, A. C. et al. Atividade antisséptica do óleo essencial de *Lippia origanoides* Cham. (Alecrim-pimenta) na presença de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 905–911, 2016. DOI: 10.1590/S0100-736X2016000900018.
- ALOV, P.; TSAKOVSKA, I.; PAJEVA, I. Computational Studies of Free Radical-Scavenging Properties of Phenolic Compounds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 85–104, 2015. DOI: 10.2174/1568026615666141209143702.
- ALVARADO-GARCÍA, P. A. A. et al. Anxiolytic-like effect of essential oils extracted from *Lippia alba* and *Lippia citriodora*. **Pharmacognosy Journal**, v. 13, n. 6, p. 1377–1383, 2021. DOI: 10.5530/PJ.2021.13.174.
- ALVES, M. S. et al. Essential Oils Composition and Toxicity Tested by Fumigation Against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) Pest of Stored Cowpea. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2387–2399, 2015. DOI: 10.5935/1984-6835.20150142.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Natural antioxidants of plant origin. In: FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L. (org.). **Functional Food Ingredients from Plants**. 1. ed. Elsevier Inc., v. 90 2019. p. 1–81. DOI: 10.1016/bs.afnr.2019.02.011.
- AMIGO, J. M. Data Mining, Machine Learning, Deep Learning, Chemometrics. Definitions, common points and Trends. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 8, n. 32, p. 22–38, 2021. DOI: 10.30744/brjac.2179-3425.ar-38-2021.
- AMORIM, A. G.; TIRAPEGUI, J. Current aspects of the relationship between physical

exercise, oxidative stress and magnesium. **Revista de Nutricao**, v. 21, n. 5, p. 563–575, 2008. DOI: 10.1590/s1415-52732008000500009.

ANAND, U. et al. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: Potential avenues of biocompatible drug discovery. **Metabolites**, v. 9, n. 11, p. 1–13, 2019. DOI: 10.3390/metabo9110258.

AÑEZ, R. B. S. **Análise morfoanatômica das folhas e casca de *Aspidosperma nitidum* Benth e *Aspidosperma marcgravianum* Woodson (Apocynaceae) com abordagem farmacognóstica e etnofarmacológica**. 115f. Tese (Doutorado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

ATKINS, S. Verbenaceae. *In: Flowering Plants, Dicotyledons*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, v. 7, 2004. p. 449–468. DOI: 10.1007/978-3-642-18617-2\_25.

AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M.; ATABE, A. N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v. 6, n. 47, p. 1-8, 2017. DOI: 10.1186/s13756-017-0208-x.

BACCI, L. et al. Toxicity, behavior impairment, and repellence of essential oils from pepper-rosmarin and patchouli to termites. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 156, n. 1, p. 66–76, 2015. DOI: 10.1111/eea.12317.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21<sup>st</sup> century. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 327–335, 2015. DOI: 10.31887/DCNS.2015.17.3/bbandelow

BANJARNAHOR, S. D. S.; ARTANTI, N. Antioxidant properties of flavonoids. **Medical Journal of Indonesia**, v. 23, n. 4, p. 239-244, 2014. DOI: 10.13181/mji.v23i4.1015.

BANSAL, A. et al. Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 4, p. 223-233, 2014. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.12.001.

BARBIERI, N. et al. Antioxidant activity and chemical composition of essential oils of three aromatic plants from la Rioja province. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 168–173, 2016. DOI: 10.3109/13880209.2015.1028077.

BARRIGA, I. B. Essential oil of *Lippia grata* (Verbenaceae) is effective in the control of

monogenean infections in *Colossoma macropomum* gills, a large Serrasalminidae fish from Amazon. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 9, p. 3804–3812, 2020. DOI: 10.1111/are.14728.

BATISTA, A. et al. Modulatory effect of *Lippia alba* essential oil on the activity of clinically used antimicrobial agents on *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae* biofilm. **Scientia Pharmaceutica**, v. 86, n. 4, p. 52, 2018. DOI: 10.3390/scipharm86040052.

BELBIN, F. E. et al. Plant Circadian Rhythms and Vertical Agriculture. In: ANPO, M.; FUKUDA, H.; WADA, T. (org.). **Plant Factory Using Artificial Light**. 1st. ed. Amsterdam, HO: Elsevier, 2019. p. 79–88. DOI: 10.1016/B978-0-12-813973-8.00007-5.

BENNEH, C. K. et al. *Maerua angolensis* stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. **J. Ethnopharmacol.**, v. 207, p. 129–145, 2017. DOI: 10.1016/j.jep.2017.06.012

BHEBHE, M.; CHIPURURA, B.; MUCHUWETI, M. Determination and comparison of phenolic compound content and antioxidant activity of selected local Zimbabwean herbal teas with exotic *Aspalathus linearis*. **South African Journal of Botany**, v. 100, p. 213–218, 2015. DOI: 10.1016/j.sajb.2015.06.006.

BRAGA, M. A. et al. Prospection of Enzyme Modulators in Aqueous and Ethanolic Extracts of *Lippia sidoides* Leaves: Genotoxicity, Digestion, Inflammation, and Hemostasis. **Chemistry and Biodiversity**, v. 16, n. 3, p. e1800558, 2019. DOI: 10.1002/cbdv.201800558.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x.

BRITO, D. I. V. et al. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 836–844, 2015. DOI: 10.1590/1983-084X/14\_060.

BRITO, G. A. et al. Identification of Bioactive Compounds against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by Bioassays and in Silico Assays. **Chemistry and Biodiversity**, v. 18, p. e2100242, 2021. DOI: 10.1002/cbdv.202100242.

BUGAYONG, A. M.; CRUZ, P.; PADILLA, P. I. Antibacterial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Leaves of Some Aromatic Plants of Philippines. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 22, n. 4, p. 932–946, 2019. DOI: 10.1080/0972060X.2019.1682683.

CÁCERES, M. et al. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. **Antibiotics**, v. 9, p. 147, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9040147.

CAMILO, C. J. et al. Traditional use of the genus *Lippia* sp. and pesticidal potential: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 40, p. 102296, 2022. DOI: 10.1016/j.bcab.2022.102296.

CAMPOLO et al. Essential Oils in Stored Product Insect Pest Control. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018. DOI: 10.1155/2018/6906105.

CÂNDIDO, T. L. N.; SILVA, M. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chemistry**, v. 177, p. 313–319, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.041.

CARDOSO, P. H. et al. Verbenaceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 69, n. 2, p. 777–786, 2018. DOI: 10.1590/2175-7860201869235.

CARDOSO-JÚNIOR, G. S. et al. Inhibitory action of *Lippia gracilis* schauer essential oil on pathogenic bacteria and its effects as a growth promoter on quail. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2021. DOI: 10.5424/sjar/2021191-16101.

CASER, M. et al. Drought stress adaptation modulates plant secondary metabolite production in *Salvia dolomitica* Codd. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 85–96, 2019. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.11.068.

CHANDRA, H. et al. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials - A review. **Plants**, v. 6, n. 2, p. 457–462, 2017. DOI: 10.3390/plants6020016.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481–487, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200042.



CORTÉS-CHITALA, M. C. et al. Identification and Quantification of Phenolic Compounds from Mexican Oregano (*Lippia graveolens* HBK) Hydroethanolic Extracts and Evaluation of Its Antioxidant Capacity. **Molecules**, v. 26, p. 702, 2021. DOI: 10.3390/molecules26030702.

COSTA, P. S. et al. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, n. 2, p. 158–171, 2017. DOI: 10.1590/2236-8906-68/2016.

DHIFI, W. et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016. DOI: 10.3390/medicines3040025.

DHINGRA, S. et al. Microbial Resistance Movements: An Overview of Global Public Health Threats Posed by Antimicrobial Resistance, and How Best to Counter. **Frontiers in Public Health**, v. 8, 2020. DOI: 10.3389/fpubh.2020.535668.

DIAS, C. N. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from Brazilian legal Amazon plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 490765, 2015. DOI: 10.1155/2015/490765.

ELVIRA-TORALES, L. I.; GARCÍA-ALONSO, J.; PERIAGO-CASTÓN, M. J. Nutritional importance of carotenoids and their effect on liver health: A review. **Antioxidants**, MDPI AG, v. 8, n.7, 2019. DOI: 10.3390/antiox8070229.

ENDRIS, A.; ASFAW, N.; BISLAT, D. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Lippia javanica* leaves from Ethiopia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 28, n. 3, p. 221–226, 2015. DOI: 10.1080/10412905.2015.1108880.

ETIENNE, T. V.; MOHAMED, C.; CHRISTIANE, A. S. A. Antifungal potential of *Lippia multiflora* Mold. and *Melaleuca leucadendron* L. essential oils against some root borne fungi of *Ipomea batatas* (L.) Lam. in Côte d'Ivoire. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 8, n. 5, p. 654–662, 2020. DOI: 10.18006/2020.8(5).654.662.

FEDOTOVA, J. et al. Therapeutical strategies for anxiety and anxiety-like disorders using plant-derived natural compounds and plant extracts. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, p. 437–446, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.107

FELIX, S. F. et al. Chemical composition, larvicidal activity, and enzyme inhibition of the essential oil of *Lippia grata* Schauer from the caatinga biome against dengue vectors. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 3, p. 250, 2021. DOI: 10.3390/ph14030250.

FIGUEIREDO, M. B. et al. Lethal and sublethal effects of essential oil of *Lippia sidoides* (verbenaceae) and monoterpenes on Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 1, p. 63–69, 2017. DOI: 10.1590/0074-02760160388.

FIKADU, Y.; YAYA, E. E.; CHANDRAVANSI, B. S. Chemical composition and antioxidant activities of the essential oils of *Lippia adoensis* Hochst ex. Walp and *Ocimum sanctum* Linn. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 36, n. 1, p. 95–108, 2022. DOI: 10.4314/bcse.v36i1.9.

FILIPPIN, L. I. et al. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 1, p. 17–24, 2008. DOI: 10.1590/S0482-50042008000100005.

FLOR, A. S. S. O.; BARBOSA, W. L. R. Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá - PA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 757–768, 2015. DOI: 10.1590/1983-084X/14\_064.

FLORES, L. et al. Efectividad de los extractos vegetales de orégano silvestre (*Lippia origanoides* K.) y citronela (*Cymbopogon citratus* D.C.) sobre *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). **Idesia**, v. 35, n. 4, p. 67–74, 2017. DOI: 10.4067/S0718-34292016005000017.

FONTANA, D. C. et al. Using essential oils to control diseases in strawberries and peaches. **International Journal of Food Microbiology**, v. 338, p. 108980, 2021. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108980.

FUNARI, C. S. et al. High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 167–178, 2012. DOI: 10.1167/iov.13-13759.

GALVÃO, J. G. et al. *Lippia gracilis* essential oil in  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: an environmentally safe formulation to control *Aedes aegypti* larvae. **Pest Management Science**, v. 75, p. 452–459, 2019. DOI: 10.1002/ps.5138.

GARCÍA-ROMO, J. S. et al. Compounds with *in vitro* antibacterial activity from hydrosol of *Lippia palmeri* and morphometric changes on *Listeria monocytogenes*. **Biotecnia**, v. 20, n. 3, p. 35–42, 2018. DOI: 10.18633/biotecnia.v20i3.713.

GEROMINI, K. V. N. et al. Fungicidal effect of *Lippia alba* essential oil on a white-rot fungus. **Maderas: Ciencia y Tecnologia**, v. 17, n. 1, p. 29–38, 2015. DOI: 10.4067/S0718-221X2015005000003.

GHASEMZADEH, A. et al. Improvement in Flavonoids and Phenolic Acids Production and Pharmaceutical Quality of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) by Ultraviolet-B Irradiation. **Molecules**, v. 21, p. 1203, 2016. DOI: 10.3390/molecules21091203.

GODOY, J. A. et al. Effect of essential oils of *Cymbopogon citratus* (Dc.) Stapf (lemon grass) and *Lippia alba* (Mill.) N. E. br. ex Britton & p. Wilson (bushy matgrass) on *Xanthomonas axonopodis* and *Ralstonia* sp. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 25, n. 4, p. e1085, 2020.

GOMES, D. S. et al. *Lippia alba* and *Lippia gracilis* essential oils affect the viability and oviposition of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 231, p. 106434, 2022. DOI: 10.1016/j.actatropica.2022.106434.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* schauer. **Ecletica Química**, v. 36, n. 1, p. 64–77, 2011. DOI: 10.1590/S0100-46702011000100005.

GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E. et al. Pharmacological evaluation of the anxiolytic-like effects of *Lippia graveolens* and bioactive compounds. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1569–1576, 2017. DOI: 10.1080/13880209.2017.1310908.

GOUVEA, D. R. et al. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernonieae) leaves. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2139–2145, 2012.

GREGÓRIO, W.; OLIVEIRA, V. B. Análise quimiométrica de infusões medicinais utilizadas popularmente. **Scientific Electronic Archives**, v. 13, n. 6, p. 68–74, 2021. DOI: 10.36560/14620211288.

GRIESSNER, J. et al. Central amygdala circuit dynamics underlying the benzodiazepine anxiolytic effect. **Molecular Psychiatry**, v. 26, p. 534–544, 2021. DOI: 10.1038/s41380-018-0310-3

GROOT, A. C. Fragrances and essential oils. In: JOHN, S. M.; JOHANSEN, J. D.; RUSTEMEYER, T.; ELSNER, P.; MAIBACH, H. I. (org.). **Kanerva's Occupational**

- Dermatology**. 3<sup>a</sup> ed. Switzerland AG: Springer International Publishing, 2020. p. 579–605. DOI: 10.1007/978-3-319-68617-2\_40.
- GROOT, A.; SCHMIDT, Erich. Part II: General Aspects. **Dermatitis**, v. 27, n. 2, p. 43–49, 2016. DOI: 10.1097/DER.000000000000174.
- GÜERECA, M. C. G. et al. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 30, n. 1, p. 43–49, 2007.
- GUEVARA, P. et al. Biocidal effect of a hexane-soluble extract of *Lippia graveolens* Kunth(Verbenaceae ). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 17, n. 4, p. 342–349, 2018.
- GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P. et al. Effect of in vitro digestion on the total antioxidant capacity and phenolic content of 3 species of oregano (*Hedeoma patens*, *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*). **Journal of Food Science**, v. 82, n. 12, p. 2832–2839, 2017. DOI: 10.1111/1750-3841.13954.
- HAIR, J. F. et al. **Análise multivariada de dados**. 6<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: Bookman, 2009.
- HANIF, M. A. et al. Essential Oils. In: MALIK, S. (org.). **Essential Oil Research**. 1<sup>a</sup> ed. Switzerland AG: Springer Nature, 2019. p. 3–17.
- HASHIM, A. M. et al. Oxidative Stress Responses of Some Endemic Plants to High Altitudes by Intensifying Antioxidants and Secondary Metabolites Content. **Plants**, v. 9, n. 7, p. 869, 2020. DOI: 10.3390/plants9070869.
- HE, L. et al. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532–553, 2017. DOI: 10.1159/000485089.
- HERNANDES, C. et al. *Lippia origanoides* essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 900–910, 2017. DOI: 10.1111/jam.13398.
- ILBOUDO, Z. et al. Optimizing the use of essential oils to protect stored cowpeas from *Callosobruchus maculatus* (coleoptera: Bruchinae) Damage. **African Entomology**, v. 23, n. 1, p. 94–100, 2015. DOI: 10.4001/003.023.0115.

JESUS, R. A. **Cromatografia Líquida e análises quimiométricas na diferenciação química de acessos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown e potenciais biológicos.** 183f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2018.

JESUS, R. A. et al. Application of LC-DAD Metabolic Fingerprinting in Combination with PCA for Evaluation of Seasonality and Extraction Method on the Chemical Composition of Accessions from *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown and Biological Activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 978–987, 2019. DOI: 10.21577/0103-5053.20180244.

JOSÉ-RITA, B. J. et al. Study of the chemical and in vitro cytotoxic activities of essential oils (EOs) of two plants from the Ivorian flora (*Lippia multiflora*, *Zingiber officinale*) and their antiviral activities against non-enveloped viruses. **South African Journal of Botany**, v. 000, p. 1–7, 2022. DOI: 10.1016/j.sajb.2022.03.053.

JOSHI, A. et al. Chemical Analysis and Antioxidant Activity of Essential Oils of Two Morphotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 21, n. 3, p. 687–700, 2018. DOI: 10.1080/0972060X.2018.1486232.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics: a phylogenetic approach.** 3<sup>a</sup> ed., Sunderland, Mass. : Sinauer Associates, 2008.

KAMANULA, J. F. et al. Chemical variation and insecticidal activity of *Lippia javanica* (Burm. f.) Spreng essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Industrial Crops and Products**, v. 110, p. 75–82, 2017. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.06.036.

KAMPKE, E. H. et al. Genotoxic effect of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown essential oil on fish (*Oreochromis niloticus*) and mammal (*Mus musculus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 59, p. 163–171, 2018. DOI: 10.1016/j.etap.2018.03.016.

KOBENAN, K. C. et al. Chemical composition, antioxidant activity, cholinesterase inhibitor and in vitro insecticidal potentiality of essential oils of *Lippia multiflora* Moldenke and *Eucalyptus globulus* Labill. on the main carpophagous pests of cotton plant in Ivory Coast. **Chemistry and Biodiversity**, v. 19, n. 4, p. e202100993, 2022. DOI: 10.1002/cbdv.202100993.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by

- Herbals. **British Journal of Medicine and Medical Research**, v. 7, n. 6, p. 438–457, 2015. DOI: 10.9734/bjmmr/2015/16284.
- LANDETE, J. M. Dietary Intake of Natural Antioxidants: Vitamins and Polyphenols. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 7, p. 706–721, 2013. DOI: 10.1080/10408398.2011.555018.
- LEAL, L. E. et al. Effects of essential oils from two *Lippia* species on growth of phytopathogenic fungi. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 17, n. 1, p. 30–35, 2018.
- LEYVA-LÓPEZ, N. et al. Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 187, p. 302–312, 2016. DOI: 10.1016/j.jep.2016.04.051.
- LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80–89, 2020. DOI: 10.1016/J.PLAPHY.2020.01.006.
- LIMA, A. S. et al. Assessment of the repellent effect of *Lippia alba* essential oil and major monoterpenes on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, p. 73–77, 2016. DOI: 10.1111/mve.12140.
- LIMA, C. L. S. et al. Bases fisiológicas e medicamentosas do transtorno da ansiedade. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e808997780, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i9.7780
- LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; ESTRADA-CAMARENA, E. Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 377–391, 2016. DOI: 10.1016/j.jep.2016.03.053
- LOUREIRO, R. J. et al. Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. **Revista Portuguesa de Saude Publica**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016. DOI: 10.1016/j.rpsp.2015.11.003.
- LOURENÇO, S. C.; MOLDÃO-MARTINS, M.; ALVES, V. D. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4132, 2019. DOI: 10.3390/molecules24224132.

MA, Y. M. et al. Structural Diversity and Biological Activities of Indole Diketopiperazine Alkaloids from Fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 35, p. 6659–6671, 2016. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01772.

MACÊDO, C. A. F. et al. *Lippia origanoides* essential oil induces tocolytic effect in virgin rat uterus and inhibits writhing in a dysmenorrhea mouse model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 290, p. 115099, 2022. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115099.

MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, p. 33–39, 2008.

MAGALHÃES, A. O. **Isolamento e identificação de substâncias com ação espasmolítica de folhas de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae)**. 125f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2018.

MAIA, J. L. S. et al. Hydrolate toxicity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) in juvenile tambaqui (*Collossoma macropomum*) and its potential anaesthetic properties. **Aquaculture**, v. 503, p. 367–372, 2019. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.11.058.

MAJOLO, C. et al. Chemical composition of *Lippia spp.* essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 48, p. 2380–2387, 2017. DOI: 10.1111/are.13073.

MAR, J. M. et al. *Lippia origanoides* essential oil: An efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 292–297, 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.10.033.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54–57, 2014. DOI: 10.21800/s0009-67252014000300017.

MARTIN, P. The epidemiology of anxiety disorders: A review. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 281–298, 2003. DOI: 10.31887/DCNS.2003.5.3/pmartin

MARTINS, G. R. et al. Antifungal Phenylpropanoid Glycosides from *Lippia rubella*. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 3, p. 566–572, 2019. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00975.

MCCLOSKEY, M. C.; YOUNG, T. J.; ANDERSON, S. M. The influence of acetylcholinesterase on anxiety- and depression-like behaviors in fluoxetine-treated male mice. **Bios**, v. 88, n. 1, p. 29–38, 2017. DOI: 10.1893/BIOS-D-15-00013.1

MCQUITTY, S. The Purposes of Multivariate Data Analysis Methods: an Applied Commentary. **Journal of African Business**, v. 19, n. 1, p. 124–142, 2018. DOI: 10.1080/15228916.2017.1374816.

MEDEIROS, F. C. M. et al. Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 114, p. 87–93, 2016. DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.06.003.

MEDINA-ROMERO, Y. M. et al. Essential oils of *Bursera morelensis* and *Lippia graveolens* for the development of a new biopesticides in postharvest control. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-99773-0.

MENDES, A. P. A.; PEREIRA, R. C.; ANGELIS-PEREIRA, M. C. Estresse oxidativo e sistemas antioxidantes: conceitos fundamentais sob os aspectos da nutrição e da ciência dos alimentos. In: CORDEIRO, C. A. M. (org.). **Tecnologia de Alimentos: Tópicos Físicos, Químicos e Biológicos**. 1<sup>a</sup> ed. Guarujá-SP: Editora Científica Digital, 2020. p. 296–312. DOI: 10.37885/200800988.

MIURA, P. T. et al. Study of the chemical composition and ecotoxicological evaluation of essential oils in *Daphnia magna* with potential use in aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 7, p. 3415–3424, 2021. DOI: 10.1111/are.15186.

MONTEIRO, I. N. et al. Toxicity of the *Lippia gracilis* essential oil chemotype, pinene-cineole-limonene, on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 41, n. 1, p. 181–187, 2021a. DOI: 10.1007/s42690-020-00191-y.

MONTEIRO, P. C. et al. Antimicrobial activity of essential oils from *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* against *Aeromonas* spp. **Journal of Essential Oil Research**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 152–161, 2021b. DOI: 10.1080/10412905.2020.1848653.

MONTERO-VILLEGAS, S. et al. Cytotoxic effects of essential oils from four *Lippia alba* chemotypes in human liver and lung cancer cell lines. **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, n. 3, p. 167–181, 2018. DOI: 10.1080/10412905.2018.1431966.

MORAIS, S. R. et al. Essential oil composition, antimicrobial and pharmacological activities of *Lippia sidoides* cham. (Verbenaceae) from São Gonçalo do Abaeté, Minas Gerais, Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, p. 262–270, 2016. DOI: 10.4103/0973-1296.192197.

MOTA, A. P. P.; DANTAS, J. C. P.; FROTA, C. C. Antimicrobial activity of essential oils



from *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citrates*, *Plectranthus amboinicus*, and *Cinnamomum zeylanicum* against *Mycobacterium tuberculosis*. **Ciencia Rural**, v. 48, n. 6, p. e20170697, 2018. DOI: 10.1590/0103-8478cr20170697.

MOTA, T. F. et al. Screening organic repellent compounds against *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) present in plant essential oils: Bioassay plus an in silico approach. **Acta Tropica**, v. 229, p. 106367, 2022. DOI: 10.1016/j.actatropica.2022.106367.

MUÑOZ-ACEVEDO, A. et al. New chemovariety of *Lippia alba* from Colombia: Compositional analysis of the volatile secondary metabolites and some *in vitro* biological activities of the essential oil from plant leaves. **Natural Product Communications**, p. 1–7, 2019. DOI: 10.1177/1934578X19862905.

NASCIMENTO, L. D. et al. Drying effects on chemical composition and antioxidant activity of *Lippia thymoides* essential oil, a natural source of thymol. **Molecules**, v. 26, p. 2621, 2021. DOI: 10.3390/molecules26092621.

NELO, M. **Estudo fitoquímico e de atividades biológicas da *Lippia multiflora* Moldenke de Angola**. 93f. Dissertação (Mestrado em Químico Medicinal) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2018.

NGAIBI, J. et al. Potential of an aqueous extract of *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae) in the treatment of anxiety disorders: Possible involvement of serotonergic transmission. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 03, p. 277–289, 2021. DOI: 10.30574/gscbps.2021.14.3.0079.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015. DOI: 10.1039/c4ra13315c.

NONATO, C. F. A. et al. Comparative analysis of chemical profiles and antioxidant activities of essential oils obtained from species of *Lippia* L. by chemometrics. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132614, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132614.

NUNES, A. R. et al. Photoprotective potential of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 189, n. July, p. 119–123, 2018. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.10.013.

OKHALE, S. E. et al. Phytochemistry and Ethnopharmacology of *Lippia* Genus With a

Statement on Chemotaxonomy and Essential Oil Chemotypes. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 3, n. 5, p. 201–211, 2016. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.3(5).201-11.

OLIVEIRA, A. C. et al. Essential oils activity from plants of the Brazilian caatinga on the vegetable leafminer. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 50, p. e58313, 2020a. DOI: 10.1590/1983-40632020v5058313.

OLIVEIRA, A. S. et al. Investigation of Antioxidant Activity, Acute Toxicity and Anticholinesterasic Potential of *Lippia hirta* (Verbenaceae). **Revista Virtual de Quimica**, v. 11, n. 2, p. 432–448, 2019a. DOI: 10.21577/1984-6835.20190033.

OLIVEIRA, F. C. et al. Chemical composition and biological activities of the essential oil from leaves of *Lippia rigida*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 52, n. 6, p. 1121–1122, 2016. DOI: 10.1007/s10600-016-1881-3.

OLIVEIRA, G. T. et al. Allelopathic effect of the ethanol extract and fractions of the aerial parts of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Natural Product Research**, v. 33, n. 16, p. 2402–2407, 2019b. DOI: 10.1080/14786419.2018.1443090.

OLIVEIRA, G. T. et al. Phytochemical characterisation and bioprospection for antibacterial and antioxidant activities of *Lippia alba* Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae). **Natural Product Research**, v. 32, n. 6, p. 723–731, 2018. DOI: 10.1080/14786419.2017.1335727.

OLIVEIRA, J. et al. Antifungal activity of essential oils associated with carboxymethylcellulose against *Colletotrichum acutatum* in strawberries. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 261–267, 2019c. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.08.032.

OLIVEIRA, J. et al. Control of *Rhizopus stolonifer* in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethylcellulose. **International Journal of Food Microbiology**, v. 292, p. 150–158, 2019d. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.014.

OLIVEIRA, M. I. B. et al. *In vitro* anthelmintic efficacy of essential oils in the control of *Neoechinorhynchus buttnerae*, an endoparasite of *Colossoma macropomum*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, n. 5, p. 509–522, 2021. DOI: 10.1080/10412905.2021.1921065.

OLIVEIRA, T. N. S. et al. Antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of leaves from *Lippia gracilis* Schauer against phytopathogenic fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 4, p. 1117–1129, 2020b. DOI: 10.1111/jam.14857.

- OTENIO, J. K. et al. Etnofarmacologia da *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr: Uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 10206–10219, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n3-048.
- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. 1-15, 2016. DOI: 10.1017/jns.2016.41.
- PARENTE, M. S. R. et al. Antidepressant-like effect of *Lippia sidoides* CHAM (Verbenaceae) essential oil and its major compound thymol in mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 86, n. 3, p. 1–19, 2018. DOI: 10.3390/scipharm86030027.
- PARTRIDGE, S. R. et al. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. e00088-17, 2018. DOI: 10.1128/CMR.00088-17.
- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201–214, 2001. DOI: 10.1016/S0378-8741(01)00234-3.
- PEHLIVAN, F. E. Vitamin C: An Antioxidant Agent. In: HAMZA, A. H. (org.). **Vitamin C**. InTech, 2017. p. 23–35. DOI: 10.5772/intechopen.69660.
- PENHA, T. et al. Effects of acaricidal essential oils from *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their main components on vitellogenesis in *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 299, p. 109584, 2021. DOI: 10.1016/j.vetpar.2021.109584.
- PERERA, W. H. et al. Essential oil constituents from high altitude Brazilian species with antimicrobial activity: *Baccharis parvidentata* Malag., *Hyptis monticola* Mart. ex Benth. and *Lippia origanoides* Kunth. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 2, p. 109–116, 2016. DOI: 10.1080/10412905.2016.1210039.
- PHAMBALA, K. et al. Bioactivity of Common Pesticidal Plants on Fall Armyworm Larvae (*Spodoptera frugiperda*). **Plants**, v. 9, n. 1, p. 112, 2020. DOI: 10.3390/plants9010112.
- PORFÍRIO, E. M. et al. *In vitro* antibacterial and antibiofilm activity of *Lippia alba* essential oil, citral, and carvone against *Staphylococcus aureus*. **Scientific World Journal**, p. 4962707, 2017. DOI: 10.1155/2017/4962707.

POSSAMAI, M. C. F. et al. *In vitro* bacteriostatic activity of *Origanum vulgare*, *Cymbopogon citratus*, and *Lippia alba* essential oils in cat food bacterial isolates. **Semina**, v. 40, n. 6, p. 3107–3122, 2019. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl2p3107.

RAJGOPAL, A. et al. Immunomodulatory Effects of *Lippia sidoides* Extract: Induction of IL-10 Through cAMP and p38 MAPK-Dependent Mechanisms. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 3, p. 370–377, 2015. DOI: 10.1089/jmf.2014.0096.

REID, A.; OOSTHUIZEN, C. B.; LALL, N. *In vitro* antimycobacterial and adjuvant properties of two traditional South African teas, *Aspalathus linearis* (Burm.f.) R. Dahlgren and *Lippia scaberrima* Sond. **South African Journal of Botany**, v. 128, p. 257–263, 2020. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.11.007.

RIBEIRO, D. A. et al. Influence of seasonality on the phenolic composition of *Secondatia floribunda* A.DC (Apocynaceae) during its phenological cycle. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 12, p. 1–16, 2019. DOI: 10.1007/s11738-019-2975-x.

RIBEIRO, D. et al. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 681–699, 2018. DOI: 10.1016/j.fct.2018.07.060.

RIBEIRO, F. P. et al. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the *Lippia origanoides* Kunth Essential Oil from the Carajás National Forest, Brazil. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 9930336, 2021. DOI: 10.1155/2021/9930336.

RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 61, p. 132-140, 2017. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.11.021.

ROCK, C. D. Phenylpropanoid Metabolism. **eLS**, p. 1–18, 2017. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001912.pub2.

ROUSSEL, S. et al. Multivariate Data Analysis (Chemometrics). In: O'DONNELL, C. P.; FAGAN, C.; CULLEN, P. J. (org.). **Process Analytical Technology for the Food Industry**. 1<sup>a</sup> ed. New York: Springer-Verlag, 2014. p. 7–59. DOI: 10.1007/978-1-4939-0311-5\_2.

SALIMENA, F. R. G.; MÚLGURA, M. E. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. **Rodriguesia**, v. 66, n. 1, p. 191–197, 2015. DOI: 10.1590/2175-7860201566110.

SALVINO, A. M. M. G. **Levantamento etnofarmacológico de plantas medicinais na Bahia: uma revisão integrativa**. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Faculdade Maria Milza, 2020.

SAMBA, N. et al. Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Lippia multiflora* Moldenke Essential Oil from Different Regions of Angola. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 155, 2020. DOI: 10.3390/molecules26010155.

SANDERS, R. W. The Genera of Verbenaceae in the Southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**, v. 5, n. 2, p. 303–358, 2001.

SANFELIU, A. B. **Aplicación de la cromatografía en capa fina (CCF) a la selección de quimiotipos de *Mentha longifolia* L. y evaluación de su potencial antioxidante**. 80f. Monografía (Licenciatura em Engenharia Agroalimentar e Ambiente Rural) - Universidade Politécnica de Valência, Valência, 2015.

SANTANA, M. F. et al. Bioactivity of essential oils for the management of *Tetranychus urticae* Koch and selectivity on its natural enemy *Neoseiulus californicus* (McGregor): A promising combination for agroecological systems. **Acarologia**, v. 61, n. 3, p. 564–576, 2021. DOI: 10.24349/acarologia/20214451.

SANTOS, K. M.; MARTINS, M. L.; NASCIMENTO, G. N. L. Levantamento etnofarmacológico das plantas medicinais utilizadas no município de Tocantinópolis – TO. **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 7, n. Especial, p. 144–151, 2020. DOI: 10.20873/uftsuple2020-8754.

SANTOS, M. C. et al. Bioactivity of essential oil from *Lippia gracilis* Schauer against two major coconut pest mites and toxicity to a non-target predator. **Crop Protection**, v. 125, p. 104913, 2019. DOI: 10.1016/j.cropro.2019.104913.

SARRAZIN, S. L. F. et al. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* kunth. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 1860–1871, 2015. DOI: 10.3390/molecules20021860.

SARTORI, S. B.; SINGEWALD, N. Novel pharmacological targets in drug development for the treatment of anxiety and anxiety-related disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 204, p. 107402, 2019. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.107402

SASIKUMAR, J. M.; ERBA, O.; EGIGU, M. C. *In vitro* antioxidant activity and polyphenolic

content of commonly used spices from Ethiopia. **Heliyon**, v. 6, n. 9, p. e05027, 2020. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05027.

SCHIELE, M. A.; DOMSCHKE, K. Epigenetics at the crossroads between genes, environment and resilience in anxiety disorders. **Genes, Brain and Behavior**, v. 17, n. 3, p. e12423, 2018. DOI: 10.1111/gbb.12423

SHAMLOO, M. et al. Effects of genotype and temperature on accumulation of plant secondary metabolites in Canadian and Australian wheat grown under controlled environments. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9133, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-09681-5.

SILVA, A. M. S. et al. Prospecting of essential oils in combination with florfenicol against motile *Aeromonas* isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 7, p. 392, 2022. DOI: 10.1007/s00203-022-03015-4.

SILVA, A. P. et al. Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) essential oils. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–17, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0175598.

SILVA, F. S. et al. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 25–34, 2016. DOI: 10.3109/13880209.2015.1005751.

SILVA, F. S. et al. Pharmacological basis for traditional use of the *Lippia thymoides*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 463248, 2015. DOI: 10.1155/2015/463248.

SILVA, M. C. C. et al. Essential oil from *Lippia microphylla* Cham. modulates nitric oxide pathway and calcium influx to exert a tocolytic effect in rat uterus. **Natural Product Research**, v. 35, n. 6, p. 1046–1051, 2021a. DOI: 10.1080/14786419.2019.1614578.

SILVA, R. S. et al. Antimicrobial activity of *Lippia gracilis* essential oils on the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their effect on membrane integrity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 160, p. 40–48, 2019a. DOI: 10.1016/j.pestbp.2019.06.014.

SILVA, S. G. et al. Chemical profile of *Lippia thymoides*, evaluation of the acetylcholinesterase inhibitory activity of its essential oil, and molecular docking and molecular dynamics simulations. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1–17, 2019b. DOI: 10.1371/journal.pone.0213393.

SILVA, S. G. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction to obtain *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae) essential oil rich in thymol and evaluation of its antimicrobial activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 168, p. 105064, 2021b. DOI: 10.1016/j.supflu.2020.105064.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGH, R.; GEETANJALI. Chemotaxonomy of Medicinal Plants: Possibilities and Limitations. In: MANDAL, S. C.; MANDAL, V.; KONISHI, T. **Natural Products and Drug Discovery: An Integrated Approach**. Amsterdã, NL: Elsevier, 2018. p. 119–136. DOI: 10.1016/B978-0-08-102081-4.00006-X.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. et al. Anti-hyperalgesic effect of *Lippia grata* leaf essential oil complexed with  $\beta$ -cyclodextrin in a chronic musculoskeletal pain animal model: Complemented with a molecular docking and antioxidant screening. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 739–747, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.05.009.

SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) NE Brown ex Britt. & Wils.(Falsa-melissa) Verbenaceae**. 189f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

SORO, L. C. et al. Influence of geography, seasons and pedology on chemical composition and anti-inflammatory activities of essential oils from *Lippia multiflora* Mold leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 587–594, 2016. DOI: 10.1016/j.jep.2016.10.047.

SOUSA, M. A. A. et al. Chemical composition and phytotoxic activity of *Lippia origanoides* essential oil on weeds. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14, n. 3, p. 3015–3024, 2020. DOI: 10.21475/ajcs.20.14.03.p2595.

SOUSA, S. M. **Contribuições à biosistemática do gênero *Lippia* L. (Verbenaceae)**. 131f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

SOUSA, S. M. et al. Relationship between pollen morphology and chromosome numbers in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 1, p. 147–157, 2013. DOI: 10.1590/S0001-37652013005000010.

SOUZA, C. F. et al. Physiological responses of *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) to anesthesia with essential oils from two different chemotypes of *Lippia alba*. **Neotropical**

**Ichthyology**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2017a. DOI: 10.1590/1982-0224-20160083.

SOUZA, L. I. O. et al. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1055–1064, 2017b. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.11.121.

STRÖHLE, A.; GENSICHEN, J.; DOMSCHKE, K. The Diagnosis and Treatment of Anxiety Disorders. **Deutsches Ärzteblatt international**, v. 115, n. 37, p. 611–620, 2018. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0611

TEODORO, A. V. et al. Toxicity and repellency of the essential oil from *Lippia gracilis* to the coconut mite *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae). **International Journal of Acarology**, v. 47, n. 5, p. 414–417, 2021. DOI: 10.1080/01647954.2021.1922497.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1–20, 2016. DOI: 10.1111/boj.12385.

TRONCOSO, N. S. Los Géneros de Verbenáceas de Sudamérica extratropical (Argentina, Chile, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Sur de Brasil). **Darwiniana**, v. 18, n. 3–4, p. 104–114, 1974.

VARMUZA, K.; FILZMOSE, P. **Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics**. 1<sup>a</sup> ed., Boca Raton: CRC press, 2009.

VASCONCELOS, T. B. et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 213–219, 2014. DOI: 10.17921/2447-8938.2014v16n3p%25p.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D. et al. Control of *Staphylococcus aureus* biofilms by the application of single and combined treatments based in plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 286, p. 128–138, 2018. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.007.

VERAS, H. N. H. et al. Enhancement of aminoglycosides and  $\beta$ -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2790–S2795, 2017. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.10.030.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.



VOSSEN, L. E. et al. Chronic Exposure to Oxazepam Pollution Produces Tolerance to Anxiolytic Effects in Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science and Technology**, v. 54, p. 1760–1769, 2020. DOI: 10.1021/acs.est.9b06052

VUOLO, M. M.; LIMA, V. S.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. *In*: CAMPOS, M. R. S. (org.). **Bioactive Compounds**. Woodhead Publishing, 2019. p. 33–50. DOI: 10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5.

WHO. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates**. Geneva: World Health Organization, 2017.

XAVIER, A. L. et al. Chemical composition, antitumor activity, and toxicity of essential oil from the leaves of *Lippia microphylla*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 70, n. 5–6, p. 129–137, 2015. DOI: 10.1515/znc-2014-4138.

XU, D. P. et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 96, 2017. DOI: 10.3390/ijms18010096.

ZILLO, R. R. et al. Carboxymethylcellulose coating associated with essential oil can increase papaya shelf life. **Scientia Horticulturae**, v. 239, p. 70–77, 2018.

ZOUARI, N. Essential Oils Chemotypes: A Less Known Side. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 02, n. 02, p. 1–2, 2013. DOI: 10.4172/2167-0412.1000e145.

## CAPÍTULO 1

**Artigo 1:** Comparative analysis of chemical profiles and antioxidant activities of essential oils obtained from species of *Lippia* L. by chemometrics.

**Autores:** Carla de Fatima Alves Nonato, Cicera Janaine Camilo, Débora Odília Duarte Leite, Mário Gustavo Lúcio Albuquerque da Nobrega, Jaime Ribeiro-Filho, Irwin Rose Alencar de Menezes, Josean Fachine Tavares, José Galberto Martins da Costa.

**Periódico:** Food Chemistry.

**Link:** <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132614>.

**Qualis:** A1 (Percentil 94,76).

**Fator de Impacto (JCR):** 9,231.

**Situação:** Publicado.

**Resumo:** Devido à importância das doenças associadas ao estresse oxidativo, a busca por antioxidantes naturais mostra-se essencial. Este trabalho teve como objetivo comparar a composição química e o potencial antioxidante de óleos essenciais do gênero *Lippia* L. por meio de análises quimiométricas. Os óleos essenciais foram caracterizados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os potenciais antioxidantes foram determinados por DPPH, ABTS, proteção da desoxirribose e  $\beta$ -caroteno, quelação e redução de ferro. Todos os dados foram relacionados por análises multivariadas. Os óleos essenciais apresentaram composições químicas com baixa semelhança e nenhuma relação estatisticamente significativa. Estes apresentaram atividade antioxidante relevante, principalmente para *L. sidoides* que obteve IC<sub>50</sub> de  $5,22 \pm 0,08$   $\mu\text{g/mL}$  na captura de ABTS. Análises multivariadas mostraram a eficácia de compostos de *L. alba* na eliminação de DPPH, redução de  $\text{Fe}^{3+}$  e proteção de  $\beta$ -caroteno, e componentes de *L. gracilis* na proteção de desoxirribose. Assim, estudos que comprovem o potencial antioxidante dos compostos *Lippia* contra o estresse oxidativo e seu uso na conservação de alimentos são fundamentais.

**Palavras-chave:** *Lippia*; Óleos essenciais; Atividade antioxidante; PCA; HCA; Quimiometria.

1 **Comparative Analysis of Chemical Profiles and Antioxidant Activities of Essential Oils**  
2 **Obtained from Species of *Lippia* L. by Chemometrics**

3  
4 Carla de Fatima Alves Nonato<sup>1,2</sup>, Cicera Janaine Camilo<sup>2</sup>, Débora Odília Duarte Leite<sup>2</sup>, Mário  
5 Gustavo Lúcio Albuquerque da Nobrega<sup>2</sup>, Jaime Ribeiro-Filho<sup>3</sup>, Irwin Rose Alencar de  
6 Menezes<sup>1,4</sup>, Josean Fachine Tavares<sup>5</sup>, José Galberto Martins da Costa<sup>1,2\*</sup>

7  
8 <sup>1</sup>Postgraduate Program in Biological Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional  
9 University of Cariri, Crato, CE 63105-000, Brazil.

10 <sup>2</sup>Research Laboratory of Natural Products, Department of Biological Chemistry, Regional  
11 University of Cariri, Crato, CE 63105-000, Brazil.

12 <sup>3</sup>Laboratory of Investigation in Genetics and Translational Hematology, Gonçalo Moniz  
13 Institute (IGM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, BA 40296-710, Brazil.

14 <sup>4</sup>Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Department of Biological Chemistry,  
15 Regional University of Cariri, Crato, CE 63105-000, Brazil.

16 <sup>5</sup>Multuser Laboratory of Characterization and Analysis, Federal University of Paraíba, João  
17 Pessoa, PB 58051-900, Brazil.

18 \*Correspondence: galberto.martins@gmail.com

19  
20 **Abstract:** Due to the importance of diseases associated with oxidative stress, the search for  
21 natural antioxidants proves to be essential. This work aimed to compare the chemical  
22 composition and antioxidant potential of essential oils from the genus *Lippia* L. through  
23 chemometric analysis. The essential oils were characterized by gas chromatography coupled  
24 with mass spectrometry. Antioxidant potentials were determined by DPPH, ABTS,  
25 Deoxyribose and  $\beta$ -carotene protection, Iron chelation and reduction methods. All data were  
26 related by multivariate analyzes. Essential oils showed low similar chemical compositions and  
27 no statistically significant relationship. These showed relevant antioxidant activity, especially  
28 for *L. sidoides* that obtained IC<sub>50</sub> of 5.22±0.08  $\mu$ g/mL in ABTS capture. Multivariate analyzes  
29 showed the effectiveness of *L. alba* compounds to DPPH scavenging, Fe<sup>3+</sup> reduction and  $\beta$ -  
30 carotene protection, and *L. gracilis* components to deoxyribose protect. Thus, studies proving  
31 the antioxidant potential of *Lippia* compounds against oxidative stress and their use in food  
32 conservation are fundamental.

33  
34 **Keywords:** *Lippia*; Essential oils; Antioxidant activity; PCA; HCA; Chemometrics.

## 36 1. Introduction

37 Reactive oxygen species (ROS) are oxidizing agents capable of causing direct damage  
38 to biomolecules such as lipids, proteins and DNA, where their excessive production directly  
39 contributes to an oxidative imbalance that often results in oxidative stress, a set of harmful  
40 biochemical events that act as a trigger for the development of numerous diseases, leading to  
41 irreversible damage and cell death (Chatterjee, 2016).

42 Given the importance of oxidative stress-associated diseases in the context of global  
43 health, the search for natural antioxidants capable of neutralizing the action of free radicals has  
44 attracted the interest of researchers all over the world (Dziąbowska-Grabias et al., 2021).  
45 Natural antioxidants can be found in a wide variety of plant species, as they are produced by  
46 their secondary metabolism and stored in different parts of vegetables, including fruits, which  
47 encourages the consumption of these products to take advantage of their biological activities  
48 (Safaeian et al., 2020).

49 In this context, studies show that essential oils are endowed with pharmacological  
50 properties that make them useful in the management of diseases associated with oxidative stress  
51 (Goudjil et al., 2020). Essential oils are complex substances formed by volatile compounds such  
52 as monoterpenes and sesquiterpenes hydrocarbons and their oxygenated derivatives.  
53 Importantly, the therapeutic potential of many of these compounds has been previously reported  
54 (Giacometti et al., 2018).

55 The genus *Lippia*, the second largest genus in the family Verbenaceae, includes more  
56 than 200 species of herbs, shrubs, and small trees characterized by the presence of essential oils  
57 (Silva et al., 2018). In Brazil, this genus is the principal representant of the family, with 88  
58 species, 68 of which are endemic and distributed in biomes such as the cerrado and rupestrian  
59 fields (Salimena & Múlgura, 2015).

60 Species of *Lippia* have been widely used in the treatment of parasitic infections, asthma,  
61 stomach pain, and menstrual disorders. Additionally, Due to the significant production of  
62 essential oils, many of these species are used in the cosmetic industry, especially in the  
63 production of perfumes (Soto-Armenta et al., 2019). Accordingly, previous studies have  
64 reported the analgesic, anti-inflammatory, antipyretic, antihypertensive, and antimicrobial  
65 properties of species belonging to the genus (Siqueira-Lima et al., 2019).

66 Studies have demonstrated the antioxidant potential of essential oils obtained from  
67 species of *Lippia*. Importantly, evidence indicates that these substances can be successfully  
68 used in the food industry, as they are capable of increasing the concentration of phytochemicals,  
69 as well as improving the quality and conservation of food for consumption (Ishkeh et al., 2019).  
70 Despite the chemical complexity and diversity of essential oils in this genus, it has been

71 suggested that the food-improving properties of these substances are directly related to the action  
72 of phenolic monoterpenes present in the composition of these species (Cantú-Valdéz et al.,  
73 2020).

74 The mechanisms underlying the antioxidant interactions of mixtures of compounds have  
75 not been sufficiently elucidated, and for essential oils only general statements have been made,  
76 indicating, for the most part, that the antioxidant activity of the majority composition can be  
77 modulated by other components present in these mixtures (Ciesla et al., 2016). In this context,  
78 chemometric techniques can represent important alternatives in the characterization of the  
79 properties of individual constituents, as they enable the evaluation of multiple variables and  
80 their interactions, as well as allow the obtaining of a single and global response for multiple  
81 dependent variables (Diedrich et al., 2021).

82 Considering the above-mentioned evidence, this work aimed to compare the chemical  
83 composition and antioxidant potential of essential oils from three species of the genus *Lippia*  
84 L. using chemometric analysis.

85

## 86 **2. Materials and Methods**

87

### 88 *2.1. Botanical material and essential oil extraction*

89 Fresh leaves of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson (878 g) and *Lippia*  
90 *sidoides* Cham. (3000 g) were collected in the Garden of Medicinal Plants of the Regional  
91 University of Cariri (7°14'20.1" S 39°24'53.1" W) in April 2019, and exsiccate of each species  
92 was identified and deposited at the Herbarium Caririense Dárdano de Andrade Lima  
93 (HDCAL/URCA) under the registry numbers 13907 and 3038, respectively. The leaves of  
94 *Lippia gracilis* Schauer (418 g) were collected in the Gisélia Pinheiro district, Crato, Ceará,  
95 Brazil (7°13'05.2" S 39°25'44.9" W) in April 2019, and the species exsiccate were identified  
96 and registered at the Herbarium Prisco Bezerra of the Federal University of Ceará (registry  
97 number 44456). For both collection areas, according to the Köppen classification, the climate  
98 is AW, corresponding to a humid tropical climate, with an average annual rainfall of 850 mm,  
99 an average air temperature of 27 °C and a relative humidity of around 75% (Vásquez et al.,  
100 2019).

101 Essential oil extraction was performed by hydrodistillation in a Clevenger-type  
102 apparatus. Fresh leaf samples were crushed and subjected to distillation for 2 h (ANVISA,  
103 2019). After extraction, the essential oils of *L. alba* (LaEO), *L. sidoides* (LsEO) and *L. gracilis*  
104 (LgEO) were dried with anhydrous sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), presenting yields (w/w) of 0.18%,  
105 0.52%, and 0.89% respectively.

106

107 *2.2. Chemicals and solvents*

108 All chemicals were analytical grade. Dichloromethane, chloroform, and methanol  
109 (MeOH) were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Hesse, Alemanha). Ascorbic acid,  
110 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, hydrocarbons (C8-C40), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-Azino-bis(3-  
111 ethylbenzothiazoline-6-sulphonic Acid) (ABTS), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, Deoxyribose, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
112 trichloroacetic acid (TCA), thiobarbituric acid (TBA), FeCl<sub>3</sub>, Tris-HCl, *o*-phenanthroline (*o*-  
113 phe), linoleic acid, Tween 40, and  $\beta$ -carotene were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis,  
114 Missouri, USA).

115

116 *2.3. Essential oil analysis*

117 The volatile constituents were analyzed by Gas Chromatography coupled with Mass  
118 Spectrometry (GC/MS) using a Shimadzu model GC-MS QP2010 apparatus equipped with an  
119 Rtx-5MS fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m), both provided by  
120 Shimadzu Scientific Instruments Inc. (Columbia, Maryland, USA). The temperature was  
121 programmed as follows: 60 - 240 °C at 3 °C/min; 240 - 280 °C at 10 °C/min, ending at 280 °C  
122 for with 10 min. Helium was used as the carrier gas with a flow rate of 1.5 mL/min and split  
123 mode with a 1:50 ratio. The injection port was set at 220 °C. Operating parameters of MS  
124 quadrupole: interface temperature = 240 °C; Electron impact ionization set at 70 eV with scan  
125 mass ranging from 40 to 350 m/z and sampling rate of 1.0 scan/s. Injected volume: 1  $\mu$ L of a 5  
126  $\mu$ g/mL solution in dichloromethane. The constituents were identified by computational search  
127 using digital libraries of mass spectral data (NIST 08) and by comparing their authentic mass  
128 spectra. The Kovats retention index was obtained by injecting a mixture of C8-C40 linear  
129 hydrocarbons under the same conditions as the samples, as described by Van Den Dool and  
130 Kratz (1963). The identity of the compounds was confirmed by comparing their retention  
131 indices and mass spectra with those taken from the literature (Adams, 2007).

132

133 *2.4. Antioxidant activity analysis*134 *2.4.1. DPPH free radical scavenging*

135 The DPPH free radical scavenging was determined following the method proposed by  
136 Rufino et al. (2007a). To this end, each essential oil was diluted to concentrations ranging from  
137 5 to 1000  $\mu$ g/mL. Then, wells on a 96-well plate were filled with 20  $\mu$ L of the essential oil and  
138 280  $\mu$ L of a 0.06 mM DPPH solution. After 30 min of reaction in a dark environment, the  
139 readings were taken at 515 nm in a spectrophotometer Kasuaki DR-200BS (Araucária, Paraná,  
140 Brazil). MeOH and ascorbic acid were used as the blank and positive control, respectively,

141 while the solvent + DPPH was used as the negative control. The results were calculated  
142 according to equation 1, where Abs means absorbance:

143

$$144 \quad AA\% = 100 - \{[(AbsSample - AbsBlank)/AbsNegativeControl] \times 100\}$$

145

#### 146 2.4.2. ABTS<sup>•+</sup> free radical capture

147 These analyses were carried out according to the method described by Rufino et al.  
148 (2007b). Briefly, 30  $\mu$ L of each essential oil solution (5-1000  $\mu$ g/mL) was transferred to test  
149 tubes containing 3.0 mL of ABTS<sup>•+</sup> radical and kept reacting in the absence of light for 6 min.  
150 Then, the readings were performed at 734 nm. The same controls described in the previous  
151 section were included in this assay, and results were calculated using equation 1.

152

#### 153 2.4.3. Deoxyribose oxidative degradation assay

154 The ability of the essential oils to inhibit deoxyribose degradation was assessed through  
155 the methodology of Puntel et al. (2005). The reactive mixture consisted of 240  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.8  
156 mM), 240  $\mu$ L of FeSO<sub>4</sub> (0.08 mM), 450  $\mu$ L of potassium phosphate buffer (7.5 mM, pH 7.4),  
157 150  $\mu$ L of deoxyribose (1.5 mM) and 320  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O. For each extract concentration (5 to 1000  
158  $\mu$ g/mL), 100  $\mu$ L of the sample was added to the reaction, followed by incubation at 37 °C for  
159 60 min. After this period, the reactive mixture was added with 750  $\mu$ L of 2.8% TCA and 750  
160  $\mu$ L of 0.8% TBA, followed by an additional incubation at 100 °C for 20 min. The negative  
161 control and blank consisted of the reactive mixture components in the absence of extracts and  
162 deoxyribose, respectively. After cooling, the readings were performed at 532 nm and the results  
163 were expressed as a percentage of protection according to equation 2:

164

$$165 \quad \text{Protection (\%)} = \{[AbsControl - (AbsSample - AbsBlank)] / AbsControl\} \times 100$$

166

#### 167 2.4.4. Fe<sup>2+</sup>-chelating activity and Fe<sup>3+</sup>-reducing power test

168 To analyze the Fe<sup>2+</sup>-chelating activity and Fe<sup>3+</sup>-reducing power of the essential oils we  
169 used the *o*-phe test, as reported by Minotti and Aust (1987), with some modifications.  
170 Eppendorf tubes were filled with 500  $\mu$ L of extract solution (at concentrations ranging from 5  
171 to 500  $\mu$ g/mL), 500  $\mu$ L of FeSO<sub>4</sub> (1000  $\mu$ M) or 500  $\mu$ L of FeCl<sub>3</sub> (1000  $\mu$ M), separately. After  
172 2 min of reaction, 50  $\mu$ L of this mixture were added to each well on a 96-well plate containing  
173 a mix of Milli Q water, Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4), and *o*-phe (300  $\mu$ M). Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> controls  
174 were obtained by replacing the extract solution with Milli Q water, while the blank was obtained  
175 by adding Milli Q water with the corresponding ferrous solution. The readings were performed

176 in a spectrophotometer at 510 nm and the results were expressed in percentage, according to  
177 equation 2.  $\text{Fe}^{3+}$  reducing power was determined by comparing the results with those of  $\text{Fe}^{2+}$   
178 controls.

179

#### 180 2.4.5. Co-oxidation of $\beta$ -carotene/Linoleic acid method

181 The analysis followed the methodology proposed by Rufino et al. (2006). The reaction  
182 mixture consisted of 40  $\mu\text{L}$  of linoleic acid, 530  $\mu\text{L}$  of Tween 40, 50  $\mu\text{L}$  of  $\beta$ -carotene (20  
183 mg/mL), and 1 mL of chloroform. After homogenizing the mixture, an oxygenator was used to  
184 vaporize the chloroform and Milli Q water was added until reaching an absorbance ranging  
185 between 0.6 nm and 0.7 nm at 470 nm. For testing, 250  $\mu\text{L}$  of this reactive mixture and 10  $\mu\text{L}$   
186 extract solution (5 to 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were kept reacting on wells on a microplate. The blank and  
187 controls were obtained by replacing respectively, the mixture components and extract solutions  
188 with Milli Q water. The results were expressed as a percentage of oxidation inhibition according  
189 to equation 2.

190

#### 191 2.5. *Statistical analysis*

192 The values obtained in the antioxidant assays were expressed as mean  $\pm$  standard  
193 deviation of three sample replicates ( $n = 3$ ). For antioxidant activity analysis, after data  
194 normalization, a non-linear regression was applied to obtain the  $\text{IC}_{50}$  values. Then, ANOVA  
195 and Tukey's test was applied for multiple comparisons between pairs. The GraphPad Prism  
196 software version 8.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA) was used  
197 in all analyzes and results with a  $P < 0.05$  were considered statistically significant. Principal  
198 Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) were used to compare  
199 the composition of essential oils among the three species, as well as to correlate them with their  
200 antioxidant activities. Multivariate analyzes were performed using Jamovi software version  
201 1.6.16 (Jamovi Project, Sydney, Australia).

202

### 203 **3. Results and Discussion**

204

#### 205 3.1. *Essential oil analysis*

206 The compounds identified in the essential oils, as well as their percentages and retention  
207 indices, are listed in Table 1. Our analysis identified 96.51%, 98.80%, and 98.34% of the total  
208 constituents of LaEO, LsEO, and LgEO, respectively. Qualitatively, all of them presented  
209 monoterpenes as the most abundant compounds (LaEO: 83.88%, LsEO: 91.16%, and LgEO:  
210 84.29%), which is a common feature among species of this genus (Pascual et al., 2001).



211 The main constituents found in *L. alba* oil were geranial (43.20%), neral (30.17%), and  
212 (*E*)-caryophyllene (5.76%), thus being classified as belonging to the Citral chemotype, which  
213 is recognized for having numerous biological activities such as analgesic, anti-inflammatory,  
214 antipyretic, sedative, anti-asthmatic, anti-hypertensive, antispasmodic, emmenagogue,  
215 diaphoretic, among others (Silva et al., 2018).

216 *P*-cymene (44.83%), thymol (29.92%), and eucalyptol (8.52%) were identified as the  
217 major compounds in the essential oil of *L. sidoides*, partially differing from previous reports  
218 identifying thymol as a major compound among specimens collected in the Northeast of Brazil  
219 (Santos et al., 2015). Studies have demonstrated that the chemical composition and yield of  
220 essential oils obtained from *Lippia* species can be influenced by abiotic factors, such as  
221 seasonality, water availability, light exposure, temperature, plant development stage, and plant  
222 nutritional status, as well as by genetic factors and procedures during and after the harvest  
223 (Soares & Tavares-Dias, 2013). These factors may be linked to the lower content of thymol  
224 content in the oil analyzed by this study, while its precursor (*p*-cymene) was found in greater  
225 concentrations.

226 On the other hand, the essential oil of *L. gracilis* proved to be rich in thymol (34.75%),  
227 thymol methyl ether (12.38%), and *p*-cymene (12.23%), which is in line with previous studies  
228 analyzing species collected in the state of Maranhão, reporting the same compounds among the  
229 major components (Franco et al., 2014). Curiously, carvacrol, an isomer of thymol, represented  
230 only 10.06% of the total composition of LgEO, corroborating the evidence showing a linear  
231 relationship between the contents of these isomers among species, i.e., if the concentration of  
232 thymol is high, the concentration of carvacrol is low, and vice-versa (Nezhadali et al., 2014).

233 In addition to these major compounds, myrcene, linalool, caryophyllene oxide, and (*E*-  
234 caryophyllene were identified in the essential oils of the species, the latter representing 5.76%,  
235 3.56%, and 6.70% of the essential oils of LaEO, LsEO, and LgEO, respectively.

236

### 237 3.2. Antioxidant activity

238 At a concentration of 1000 µg/mL, the essential oils of *L. gracilis*, *L. sidoides* and *L.*  
239 *alba* showed DPPH-scavenging activities, with inhibitions of 60.05%, 58.53%, and 29.89%,  
240 respectively (Figure 1A). In addition to presenting very similar scavenging capacity, LgEO and  
241 LsEO present statistically comparable IC<sub>50</sub> values, as shown in Table 2. It has been  
242 demonstrated that the essential oils obtained from fresh and dried leaves of *Lippia thymoides*  
243 Mart. & Schauer (which are rich in thymol) showed DPPH-scavenging activities that were  
244 correlated with the concentration of thymol, with inhibition percentages ranging from 65.28 to  
245 89.97% (Nascimento et al., 2021).

246 The structural characteristics of thymol, especially the presence of phenolic hydroxyl  
247 and alkyl groups in the *ortho* and *meta* positions favor its antioxidant properties. The latter  
248 increases the electronic density of phenoxyl radicals formed by hydrogen donation, stabilizing  
249 them by inductive effects and thus enhancing the anti-radical activity (Aprotosoiaie et al., 2019).

250 All essential oils evaluated in this study showed significant ability to capture the ABTS  
251 radical, with an emphasis on the activity of LsEO and LgEO, which presented inhibition  
252 percentages corresponding to 99% at the concentrations of 500 and 1000  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.  
253 These percentages were very close to that obtained by ascorbic acid, which had 100% inhibition  
254 efficiency at 500  $\mu\text{g/mL}$ , as shown in Figure 1B. Importantly, LaEO, LsEO and LgEO presented  
255 significantly lower  $\text{IC}_{50}$  values than that of the positive control (ascorbic acid), confirming their  
256 relevant antioxidant potential (Table 2).

257 The ABTS radical is comparatively more reactive than the DPPH radical, as the oxidant  
258 mechanism of the former involves electron transfer, while the latter involves the transfer of H  
259 atoms (Kaviarasan et al., 2007). In addition, the ABTS test can be used for both water-soluble  
260 and fat-soluble samples, whereas the DPPH reagent should be preferentially used for organic  
261 solvents (Sucupira et al., 2014). These factors may explain the differences in the results  
262 obtained from these analyses.

263 The deoxyribose protection test showed that the essential oils were effective in  
264 neutralizing the  $\text{OH}^{\bullet}$  radical, where the percentages of inhibition followed the order LaEO >  
265 LsEO > LgEO, as shown in Figure 1C. The  $\text{IC}_{50}$  of the samples did not differ statistically from  
266 ascorbic acid, except for LgEO, which was less effective when compared to the others (Table  
267 2).

268 She et al. (2019), following the composition of the essential oil of *Litsea cubeba* (Lour.)  
269 Pers., for three months, identified citral as the major constituent of the essential oils of the  
270 samples studied in this period, demonstrating that this compound has significant  $\text{OH}^{\bullet}$ -  
271 neutralizing activity, with  $\text{IC}_{50}$  of 0.14%, 0.04% and 0.31% (v/v). Furthermore, *in vivo* studies  
272 showed that citral is effective in reducing both intracellular and extracellular concentrations of  
273 ROS (Safaeian et al., 2020).

274 On the other hand, when compared to quercetin ( $\text{IC}_{50} = 4.61 \mu\text{g/mL}$ ) and carvacrol ( $\text{IC}_{50}$   
275 =  $8.00 \mu\text{g/mL}$ ), thymol ( $\text{IC}_{50} = 0.23 \mu\text{g/mL}$ ) had more potent  $\text{OH}^{\bullet}$ -eliminating activity (Stoilova  
276 et al., 2008). Evidence indicates that the radical elimination mechanism by thymol occurs  
277 through the production of the phenoxyl radical as a transient species, which is formed mainly  
278 from adducts, with the addition of the  $\text{OH}^{\bullet}$  radical both in the *ortho* position (which is more  
279 energetically favorable) and in the phenolic group, which undergoes dehydration, generating  
280 the phenoxyl radical (Venu et al., 2013).

281 Thymol is also recognized to be able to increase levels of antioxidant compounds and  
282 oxygen uptake in plant tissues, including enzymatic and non-enzymatic systems, which leads  
283 to increased oxygen radical uptake and hydroxyl radical scavenging capacity of tissues,  
284 improving disease resistance and minimizing physiological degradation (Perumal et al., 2021).  
285 In addition, both thymol and citral hold GRAS status, generally recognized as safe, and are  
286 approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) and can be used as food  
287 flavoring and preservatives (Masyita et al., 2022).

288 The  $\text{Fe}^{3+}$  reduction test is used to evaluate the ability of compounds to reduce  $\text{Fe}^{3+}$  to  
289  $\text{Fe}^{2+}$  through the donation of hydrogen atoms (Bouzenna et al., 2017). Our analysis showed that  
290 both LaEO and LgEO exhibited higher  $\text{Fe}^{3+}$  reducing power than the positive control ascorbic  
291 acid (Figure 1D). All the essential oils, as well as ascorbic acid, exhibited a concentration-  
292 dependent effect, whereas LsEO presented the lowest  $\text{IC}_{50}$  among the essential oils (Table 2).  
293 The isolated compound citral is recognized for its ability to donate electrons, presenting a  
294 concentration-dependent  $\text{Fe}^{3+}$ -reducing activity, with an  $\text{IC}_{50}$  of 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Bouzenna et al.,  
295 2017), which corroborates the results obtained with the LaEO.

296 Also, all the essential oils exhibited  $\text{Fe}^{2+}$  chelating activity, among which LgEO, at the  
297 concentrations of 250 and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , stands out for presenting higher chelation percentages  
298 than that of ascorbic acid (Figure 1E). As for the  $\text{Fe}^{3+}$ -reducing activity, LsEO showed the  
299 lowest  $\text{IC}_{50}$  among the essential oils, followed by LaEO and LgEO. However, the positive  
300 control presented a significantly lower  $\text{IC}_{50}$  (Table 2). These results demonstrate the  
301 effectiveness of the essential oils as antioxidants that participate in the catalysis in the Fenton  
302 and Haber-Weiss reactions, originating reactive oxygen species such as hydroxyl radicals ( $\text{HO}^{\bullet}$ )  
303 and superoxide ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) (Barreiros et al., 2006).

304 The co-oxidation test analyzed the ability of the essential oils to prevent lipid  
305 peroxidation by inhibiting the attack to  $\beta$ -carotene double bonds by the radicals generated  
306 during the oxidation of linoleic acid (Sucupira et al., 2014). The essential oils were found to  
307 neutralize the peroxide radicals, where LsEO and LgEO showed stronger activities than  
308 ascorbic acid at all tested concentrations, as shown in Figure 1F. Additionally, these essential  
309 oils presented the best  $\text{IC}_{50}$  values (Table 2), followed by the LaEO and ascorbic acid,  
310 respectively.

311 The ability to inhibit lipid peroxidation in the co-oxidation test was demonstrated by  
312 several species whose essential oils presented thymol as a major constituent. In this context,  
313 *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* presented inhibitory activities of 99.89%, (Sarikurkcu et al.,  
314 2015). Furthermore, Kazemi and Rostami (2015), studying the biological activities of the

315 essential oil of *Achillea wilhelmsii* L., found that even though thymol is not its major compound  
316 of the species, it represented 65% of the antioxidant activity presented by its oil.

317

### 318 3.3. Multivariate analysis

319 Principal Component Analysis (Figure 2) was conducted in order to explore the  
320 correlations between the chemical compositions and antioxidant potential of the essential oils.  
321 The number of principal components in the analysis was determined using the minimum  
322 eigenvalue criterion ( $> 1$ ) considering the variability of the dimensions of the antioxidant  
323 responses and correlation coefficients, explaining 100% of the total variance of data.

324 The analysis of graphically represented PCA scores shows that the chemical  
325 compositions of essential oils had little significant correlation with each other. Both PC1  
326 (weight – 25.10) and PC2 (weight – 22.90) played important roles in this differentiation, with  
327 PC1 showing positive charges and PC2 showing both negative and positive charges. On the  
328 other hand, all antioxidant activities showed positive values for PC1 demonstrating that the  
329 chemical composition of *L. gracilis* and *L. alba* oils significantly influence their activity.

330 Accordingly, the presence of components such as camphene,  $\delta$ -3-carene, carvacrol, carvacrol  
331 acetate,  $\alpha$ -copaene, *o*-cymene,  $\alpha$ -humulene,  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -terpinene and  $\alpha$ -thujene was  
332 correlated with the antioxidant activity of the essential oils on deoxyribose degradation  
333 protection. On the other hand, compounds  $\delta$ -cadinene and (*E*)-caryophyllene showed  
334 correlations with the antioxidant activity on the ABTS and iron-chelating assays.

335 The present PCA analysis also indicates that most antioxidant activities are directly  
336 correlated with *o*-cymene,  $\beta$ -elemene, geranial, geraniol, geranyl acetate, germacrene D, 6-  
337 methyl-Hept-5-en-2-one, linalool, neral, nerol, thuja- 2,4 (10)-diene, and vinyl amyl carbinol.  
338 These results showed that most of the antioxidant activity and essential oil content had a high  
339 load on PC1, showing *L. gracilis* and *L. alba* as species whose essential oils present the highest  
340 antioxidant activity and best essential oil content. On the other hand, *L. sidoides* had the most  
341 negative scores on PC1 and PC2, corroborating the weakest antioxidant activity and poorest  
342 essential oil content.

343 The chemical composition similarity among the species was analyzed by Euclidean  
344 distance matrix using heatmap cluster analysis. This visual representation of numerical data  
345 shows individual values as colors where higher and lower numerical values are represented by  
346 darker-colored and lighter-colored squares, respectively and dendrograms demonstrate the  
347 relationships between groups in rows and columns.

348 A heatmap showing the two-dimensional grouping of species and variables (chemical  
349 composition and antioxidant activity) is shown in Figure 3, where the grouping relationships at

350 the top represent the species, while those on the left represent the variables. The variability  
351 dispersion analysis clearly confirms that the species under investigation are chemically  
352 differentiated. Cluster 1 is characterized by the variables *o*-cymene,  $\beta$ -elemene, geranial,  
353 geraniol, geranyl acetate, germacrene D, 6-methyl-Hept-5-en-2-one, linalool, neral, nerol,  
354 thuja-2, 4 (10)-diene, and vinyl amyl carbinol, which have relatively high weights for *L. alba*.  
355 On the other hand, cluster 2, composed of the variables 9-epi-(*E*)-caryophyllene and  $\delta$ -cadinene,  
356 contribute with low weight for *L. sidoides* and intermediate weight for *L. alba* and *L. gracilis*,  
357 while in cluster 3, 11-bicyclo[7, 2,0]undecan-3-ol, 9-epi-(*E*)-caryophyllene, *p*-cymene,  
358 eucalyptol, limonene, spathulenol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, verbenone, viridiflorene, and  
359 zonarene have relatively high weight for *L. sidoides* and intermediate weight for *L. alba* and *L.*  
360 *gracilis*. Finally, cluster 4 demonstrates the chemical composition of greater weight for *L.*  
361 *gracilis* and less weight for *L. sidoides* and *L. alba*.

362 The variables at the top of the heatmap demonstrate that *L. sidoides* and *L. gracilis*  
363 (cluster 2) give a smaller contribution to the antioxidant activity, while cluster 1, represented  
364 by *L. alba*, demonstrates a greater contribution to the antioxidant capacity. Thus, we can  
365 conclude that the chemical composition of the essential oil of *L. alba* has greater general  
366 antioxidant power compared to the other species evaluated in this study.

367

#### 368 4. Conclusions

369

370 The present study demonstrated the relationship between the chemical composition and  
371 the *in vitro* antioxidant activity of species of genus *Lippia* found in Cariri, Ceará. The essential  
372 oils of *L. alba*, *L. sidoides* and *L. gracilis* showed little similar chemical compositions and no  
373 statistically significant relationship. However, these oils presented relevant antioxidant activity  
374 in view of the different mechanisms studied, which is related to the action of different and non-  
375 majority compounds, as demonstrated by the multivariate analyses, especially those that have  
376 double bonds and hydroxyls in their structure.

377 Multivariate analyzes demonstrated the effectiveness of compounds present in *L. alba*  
378 on DPPH free radical scavenging, reduction of Fe<sup>3+</sup> ion, and inhibition of  $\beta$ -carotene oxidation,  
379 while deoxyribose degradation protection was linked mainly to the compounds identified in *L.*  
380 *gracilis*. On the other hand, ABTS radical capture and Fe<sup>2+</sup> ion chelation have intermediate  
381 relationships with the composition of *L. alba* and *L. gracilis*. The antioxidant potential of the  
382 essential oils of these species for food systems still needs to be deepened with studies that seek  
383 to verify their direct action as natural preservatives as well as their applications in enriched

384 packaging films, being able to determine their performance and their effective use in food  
385 products.

386 Finally, both cluster analysis and PCA analysis classified the variables by their  
387 similarity, reducing data redundancy, demonstrating that chemometric tools are valuable to  
388 correlate the antioxidant activity and chemical composition of a given species and therefore,  
389 can be used in the future to select the components that have a greater contribution to the  
390 antioxidant potential of natural products.

391

#### 392 **CRedit authorship contribution statement**

393 **Carla de Fatima Alves Nonato:** Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Writing -  
394 Original Draft. **Cicera Janaine Camilo:** Investigation. **Débora Odília Duarte Leite:**  
395 Investigation. **Jaime Ribeiro-Filho:** Writing - Review & Editing, English translation. **Mário**  
396 **Gustavo Lúcio Albuquerque da Nobrega:** Writing - Review & Editing. **Irwin Rose Alencar**  
397 **de Menezes:** Formal analysis, Writing - Review & Editing. **Josean Fechine Tavares:**  
398 Investigation, Writing - Review & Editing. **José Galberto Martins da Costa:**  
399 Conceptualization, Writing - Review & Editing, Supervision.

400

#### 401 **Declaration of Competing Interest**

402 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal  
403 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

404

#### 405 **References**

406

407 Adams, R. P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/  
408 Quadrupole Mass Spectroscopy. 4th Edition. Allured Pub. Corp.

409 ANVISA. National Health Surveillance Agency. (2019) *Farmacopeia Brasileira* (6th ed.).

410 ANVISA (Volume 1).

411 Aprotosoiaie, A. C., Miron, A., Ciocârlan, N., Brebu, M., Roşu, C. M., Trifan, A., Vochiţa, G.,  
412 Gherghel, D., Luca, S. V., Niţă, A., Costache, I. I., & Mihai, C. T. (2019). Essential oils of  
413 Moldavian *Thymus* species: Chemical composition, antioxidant, anti-*Aspergillus* and  
414 antigenotoxic activities. *Flavour and Fragrance Journal*, 34(3), 175–186.  
415 <https://doi.org/10.1002/ffj.3490>

416 Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., & David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: Relação entre  
417 geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quimica Nova*, 29(1), 113–123.  
418 <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>

- 419 Bouzenna, H., Hfaiedh, N., Giroux-Metges, M., Elfeki, A., & Talarmin, H. (2017). Biological  
420 properties of citral and its potential protective effects against cytotoxicity caused by aspirin in  
421 the IEC-6 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87, 653–660.  
422 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.104>
- 423 Cantú-Valdéz, J. A., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Martínez, C. A., Sinagawa-García, S. R.,  
424 Quintero-Ramos, A., Hume, M. E., Herrera-Balandrano, D. D., & Méndez-Zamora, G. (2020).  
425 Mexican oregano essential oils as alternatives to butylated hydroxytoluene to improve the shelf  
426 life of ground beef. *Food Science and Nutrition*, 8(8), 4555–4564.  
427 <https://doi.org/10.1002/fsn3.1767>
- 428 Chatterjee, S. (2016). Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. In *Oxidative Stress and*  
429 *Biomaterials* (pp. 35–58). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803269-5.00002-4>
- 430 Ciesla, L. M., Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczuk, A., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2016).  
431 Antioxidant synergism and antagonism between selected monoterpenes using the 2,2-diphenyl-  
432 1-picrylhydrazyl method. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(6), 412–419.  
433 <https://doi.org/10.1002/ffj.3330>
- 434 Diedrich, C., Silva, L. D., Sari, R., Borges, G. C. C., Muniz, H. S., Lima, V. A., Oldoni, T. L.  
435 C., & Carpes, S. T. (2021). Bioactive compounds extraction of *Croton lechleri* barks from  
436 Amazon forest using chemometrics tools. *Journal of King Saud University - Science*, 33(4),  
437 101416. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101416>
- 438 Działowska-Grabias, K., Sztanke, M., Zajac, P., Celejewski, M., Kurek, K., Szkutnicki, S.,  
439 Korga, P., Bulikowski, W., & Sztanke, K. (2021). Antioxidant Therapy in Inflammatory Bowel  
440 Diseases. *Antioxidants*, 10(3), 412. <https://doi.org/10.3390/antiox10030412>
- 441 Franco, C. S., Ribeiro, A. F., Carvalho, N. C. C., Monteiro, O. S., Silva, J. K. R., Andrade, E.  
442 H. A., & Maia, J. G. S. (2014). Composition and antioxidant and antifungal activities of the  
443 essential oil from *Lippia gracilis* Schauer. *African Journal of Biotechnology*, 13(30), 3107–  
444 3113. <https://doi.org/10.5897/ajb2012.2941>
- 445 Giacometti, J., Kovačević, D. B., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., Stulić, V.,  
446 Barba, F. J., Chemat, F., Barbosa-Cánovas, G., & Jambrak, A. R. (2018). Extraction of bioactive  
447 compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative  
448 techniques: A review. *Food Research International*, 113, 245–262.  
449 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.036>
- 450 Goudjil, M. B., Zighmi, S., Hamada, D., Mahcene, Z., Bencheikh, S. E., & Ladjel, S. (2020).  
451 Biological activities of essential oils extracted from *Thymus capitatus* (Lamiaceae). *South*  
452 *African Journal of Botany*, 128, 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.020>

- 453 Ishkeh, S. R., Asghari, M., Shirzad, H., Alirezalu, A., & Ghasemi, G. (2019). Lemon verbena  
454 (*Lippia citrodora*) essential oil effects on antioxidant capacity and phytochemical content of  
455 raspberry (*Rubus ulmifolius* subsp. *sanctus*). *Scientia Horticulturae*, *248*, 297–304.  
456 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.12.040>
- 457 Kaviarasan, S., Naik, G. H., Gangabthagirathi, R., Anuradha, C. V., & Priyadarsini, K. I. (2007).  
458 *In vitro* studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum*  
459 *Graecum*) seeds. *Food Chemistry*, *103*(1), 31–37.  
460 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.064>
- 461 Kazemi, M., & Rostami, H. (2015). Chemical composition and biological activities of Iranian  
462 *Achillea wilhelmsii* L. essential oil: A high effectiveness against *Candida* spp. and *Escherichia*  
463 strains. *Natural Product Research*, *29*(3), 286–288.  
464 <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.953949>
- 465 Masyita, A., Sari, R. M., Astuti, A. D., Yasir, B., Rumata, N. R., Emran, T. B., Firzan Nainu,  
466 F., & Simal-Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of  
467 essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives.  
468 *Food Chemistry: X*, 100217. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217>.
- 469 Minotti, G., & Aust, S. D. (1987). An investigation into the mechanism of citrate  $Fe^{2+}$ -  
470 dependent lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, *3*(6), 379–387.  
471 [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(87\)90016-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(87)90016-5)
- 472 Nascimento, L. D., Silva, S. G., Cascaes, M. M., Costa, K. S., Figueiredo, P. L. B., Costa, C.  
473 M. L., Andrade, E. H. A., & Faria, L. J. G. (2021). Drying effects on chemical composition and  
474 antioxidant activity of *Lippia thymoides* essential oil, a natural source of thymol. *Molecules*,  
475 *26*(9). <https://doi.org/10.3390/molecules26092621>
- 476 Nezhadali, A., Nabavi, M., Rajabian, M., Akbarpour, M., Pourali, P., & Amini, F. (2014).  
477 Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and *in vitro*  
478 antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran. *Beni-Suef University Journal*  
479 *of Basic and Applied Sciences*, *3*(2), 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2014.05.001>
- 480 Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Mata, D. S., & Villar, A. (2001). *Lippia*: Traditional  
481 uses, chemistry and pharmacology: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, *76*(3), 201–214.  
482 [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00234-3)
- 483 Perumal, A. B., Huang, L., Nambiar, R. B., He, Y., Li, X., & Sellamuthu, P. S. (2021).  
484 Application of essential oils in packaging films for the preservation of fruits and vegetables: A  
485 review. *Food Chemistry*, *375*, 131810. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131810>.



- 486 Puntel, R. L., Nogueira, C. W., & Rocha, J. B. T. (2005). Krebs cycle intermediates modulate  
487 thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain *in vitro*. *Neurochemical*  
488 *Research*, *30*(2), 225–235. <https://doi.org/10.1007/s11064-004-2445-7>
- 489 Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Mancini-Filho, J., & Moreira, A. V. B. (2006).  
490 Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no Sistema  
491  $\beta$ -caroteno/Ácido Linoléico. In *Comunicado Técnico on line* (Vol. 126).
- 492 Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G. G., Pérez-jiménez,  
493 J., & Saura-Calixto, F. D. (2007a). Metodologia Científica: Determinação da Atividade  
494 Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. In *Comunicado Técnico*  
495 *on line* (Vol. 127).
- 496 Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G. G., Pérez-jiménez,  
497 J., & Saura-Colixto, F. D. (2007b). Metodologia Científica: Determinação da Atividade  
498 Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. In *Comunicado Técnico*  
499 *on line* (Vol. 127).
- 500 Safaeian, L., Sajjadi, S. E., Montazeri, H., Ohadi, F., & Javanmard, S. (2020). Citral protects  
501 human endothelial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Turkish Journal*  
502 *of Pharmaceutical Sciences*, *17*(5), 549–554. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2019.71602>
- 503 Salimena, F. R. G., & Múlgura, M. E. (2015). Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil.  
504 *Rodriguesia*, *66*(1), 191–197. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566110>
- 505 Santos, C. P., Oliveira, T. C., Pinto, J. A. O., Fontes, S. S., Cruz, E. M. O., Arrigoni-Blank, M.  
506 F., Andrade, T. M., Matos, I. L., Alves, P. B., Innecco, R., & Blank, A. F. (2015). Chemical  
507 diversity and influence of plant age on the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. germplasm.  
508 *Industrial Crops and Products*, *76*, 416–421. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.017>
- 509 Sarikurkcu, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., & Aktumsek, A. (2015).  
510 Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum*  
511 *vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and*  
512 *Products*, *70*, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.030>
- 513 She, Q. H., Li, W. S., Jiang, Y. Y., Wu, Y. C., Zhou, Y. H., & Zhang, L. (2019). Chemical  
514 composition, antimicrobial activity and antioxidant activity of *Litsea cubeba* essential oils in  
515 different months. *Natural Product Research*, *34*(22), 3285–3288.  
516 <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1557177>
- 517 Silva, R. E. R., Santiago, I. C., Bitu, V. C. N., Kerntopf, M. R., Menezes, I. R. A., & Barbosa,  
518 R. (2018). *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson. In U. P. Albuquerque, U. Patil,  
519 & Á. Máthé (Eds.), *Medicinal and Aromatic Plants of South America* (Vol. 5, pp. 289–298).  
520 Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-024-1552-0>

- 521 Siqueira-Lima, P. S., Passos, F. R. S., Lucchese, A. M., Menezes, I. R. A., Coutinho, H. D. M.,  
 522 Lima, A. A. N., Zengin, G., Quintans, J. S. S., & Quintans-Júnior, L. J. (2019). Central nervous  
 523 system and analgesic profiles of *Lippia* genus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(1),  
 524 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.11.006>
- 525 Soares, B. V., & Tavares-Dias, M. (2013). Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu Potencial  
 526 Bioativo e Importância na Medicina Veterinária e Aquicultura. *Biota Amazônia*, 3(1), 109–123.  
 527 <https://doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v3n1p109-123>
- 528 Soto-Armenta, L. C., Sacramento-Rivero, J. C., Ruiz-Mercado, C. A., Lope-Navarrete, M. C.,  
 529 & Rocha-Uribe, J. A. (2019). Extraction yield and kinetic study of *Lippia graveolens* with  
 530 supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Supercritical Fluids*, 145, 205–210.  
 531 <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.12.018>
- 532 Stoilova, I., Bail, S., Buchbauer, G., Krastanov, A., Stoyanova, A., Schmidt, E., & Jirovetz, L.  
 533 (2008). Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of the essential oil  
 534 of *Origanum majorana* L. from Albania. *Natural Product Communications*, 3(7), 1047–1050.  
 535 <https://doi.org/10.1177/1934578x0800300704>
- 536 Sucupira, N. R., Silva, A. B., Pereira, G., & Costa, J. N. (2014). Métodos Para Determinação  
 537 da Atividade Antioxidante de Frutos. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e Da Saúde*,  
 538 14(4), 263–269.
- 539 Van Den Dool, H., & Kratz, P. D. (1963) A generalization of the retention index system  
 540 including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of*  
 541 *Chromatography A*, 11, 463-471. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80947-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80947-x)
- 542 Vásquez, M. A. N., Silva, J. B., Lima, C. T., Vásquez, E. M. F., & Sousa, F. R. R. (2019).  
 543 Produção vertical de meloeiro amarelo (*Cucumis melo* L.) com diferentes densidades em  
 544 canteiros subterrâneos cobertos com mulching plástico. *Revista Engenharia na Agricultura*,  
 545 27(4), 313-320. <https://doi.org/10.13083/reveng.v27i4.869>
- 546 Venu, S., Naik, D. B., Sarkar, S. K., Aravind, U. K., Nijamudheen, A., & Aravindakumar, C.  
 547 T. (2013). Oxidation reactions of thymol: A pulse radiolysis and theoretical study. *Journal of*  
 548 *Physical Chemistry A*, 117(2), 291–299. <https://doi.org/10.1021/jp3082358>
- 549
- 550 **Table 1.** Chemical compounds identified in the essential oils of *L. alba*, *L. sidoides* and *L.*  
 551 *gracilis*.

Nº	Compound	RI <sup>1</sup>	RI <sup>2</sup>	LaEO	LsEO	LgEO
1.	Aromadendrene	1665	1662	-	0.37±0.01 <sup>a</sup>	-
2.	11-Bicyclo [7,2,0] undecan-3-ol	1643	1644	-	0.22±0.01 <sup>a</sup>	-

3.	$\delta$ -Cadinene	1528	1530	0.53 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	-	0.39 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
4.	Camphene	953	953	-	-	0.28 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
5.	$\delta$ -3-Carene	1012	1011	-	-	0.30 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
6.	Carvacrol	1307	1307	-	0.31 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	10.06 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
7.	Carvacryl acetate	1357	1354	-	-	0.62 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
8.	( <i>E</i> )-Caryophyllene	1423	1423	5.76 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	3.55 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	6.76 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
9.	9-epi-( <i>E</i> )-Caryophyllene	1443	1442	-	0.78 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	-
10.	Caryophyllene oxide	1589	1589	1.02 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.65 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
11.	( <i>E</i> )-methyl-Cinnamate	1387	1386	-	-	6.03 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
12.	$\alpha$ -Copaene	1386	1387	-	-	0.38 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
13.	<i>o</i> -Cymene	1025	1027	0.90 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	-	-
14.	<i>p</i> -Cymene	1026	1026	-	44.83 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	12.25 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
15.	$\beta$ -Elemene	1395	1394	3.95 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	-	-
16.	Eucalyptol	1032	1032	-	8.52 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
17.	Geranial	1274	1270	43.25 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	-	-
18.	Geraniol	1257	1256	1.20 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	-	-
19.	Geranyl acetate	1379	1378	0.39 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	-	-
20.	Germacrene D	1485	1485	1.37 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	-
21.	6-methyl-Hept-5-en-2-one	986	986	3.33 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	-	-
22.	$\alpha$ -Humulene	1458	1458	-	-	0.32 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
23.	Limonene	1029	1029	-	1.33 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
24.	Linalool	1101	1101	0.99 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.28 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
25.	Myrcene	991	991	0.63 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.77 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
26.	Neral	1244	1242	30.17 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	-	-
27.	Nerol	1230	1228	1.24 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	-	-
28.	$\alpha$ -Pinene	933	933	-	1.45 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	6.11 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
29.	$\beta$ -Pinene	980	980	-	-	0.35 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
30.	Spathulenol	1584	1584	-	0.29 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	-
31.	Terpinen-4-ol	1180	1180	-	1.22 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
32.	$\alpha$ -Terpinene	1018	1018	-	-	0.68 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
33.	$\gamma$ -Terpinene	1059	1059	-	-	2.68 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
34.	$\alpha$ -Terpineol	1193	1195	-	0.70 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	-
35.	Thuja-2,4(10)-diene	1007	1009	0.43 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	-	-
36.	$\alpha$ -Thujene	923	923	-	-	0.32 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>

37.	Thymol	1298	1298	-	29.92±0.01 <sup>a</sup>	34.75±0.01 <sup>a</sup>
38.	Thymol methyl ether	1237	1237	-	1.56±0.01 <sup>a</sup>	12.38±0.01 <sup>b</sup>
39.	Verbenone	1176	1176	-	0.38±0.01 <sup>a</sup>	-
40.	Vinyl amyl carbinol	942	941	1.45±0.00 <sup>a</sup>	0.45±0.01 <sup>a</sup>	-
41.	Viridiflorene	1500	1501	-	0.25±0.01 <sup>a</sup>	-
42.	Zonarene	1527	1526	-	0.26±0.01 <sup>a</sup>	-
<b>Total</b>					<b>96.66±0.10</b>	<b>98.92±0.09</b>
					<b>98.47±0.08</b>	

552 RI<sup>1</sup>: Experimental retention index; RI<sup>2</sup>: Literature retention index; LaEO: *L. alba* essential oil;  
 553 LsEO: *L. sidoides* essential oil; LgEO: *L. gracilis* essential oil. Compound elution order: 36,  
 554 28, 40, 4, 29, 21, 25, 35, 5, 32, 13, 14, 23, 16, 33, 24, 39, 31, 34, 27, 38, 26, 18, 17, 37, 6, 7, 19,  
 555 12, 11, 15, 8, 9, 22, 20, 41, 42, 3, 30, 10, 2, 1. Means followed by different letters differ by  
 556 Tukey test with a P <0.05.

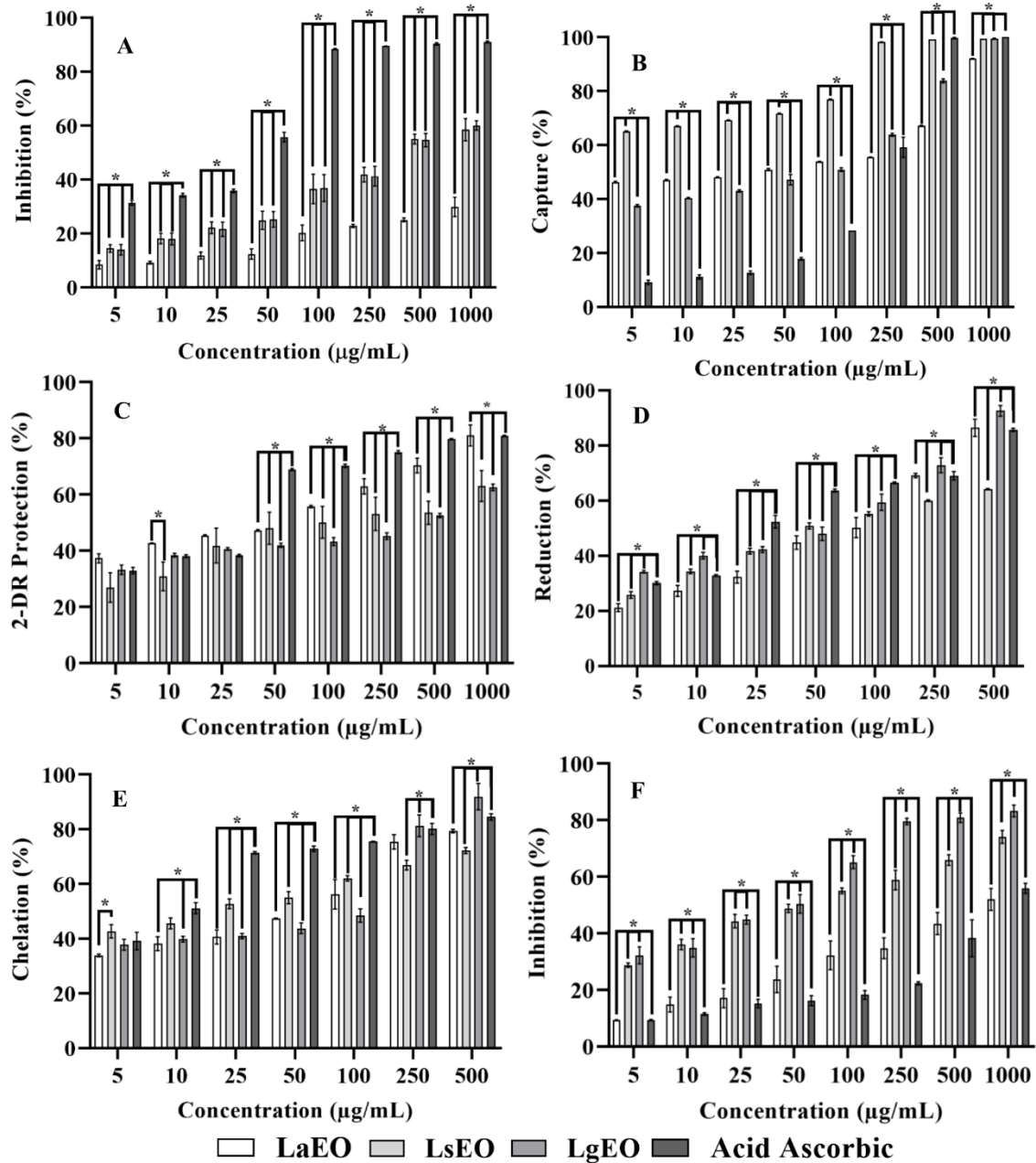
557

558 **Table 2.** IC<sub>50</sub> values of the essential oils of *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis* obtained through  
 559 different antioxidant mechanisms.

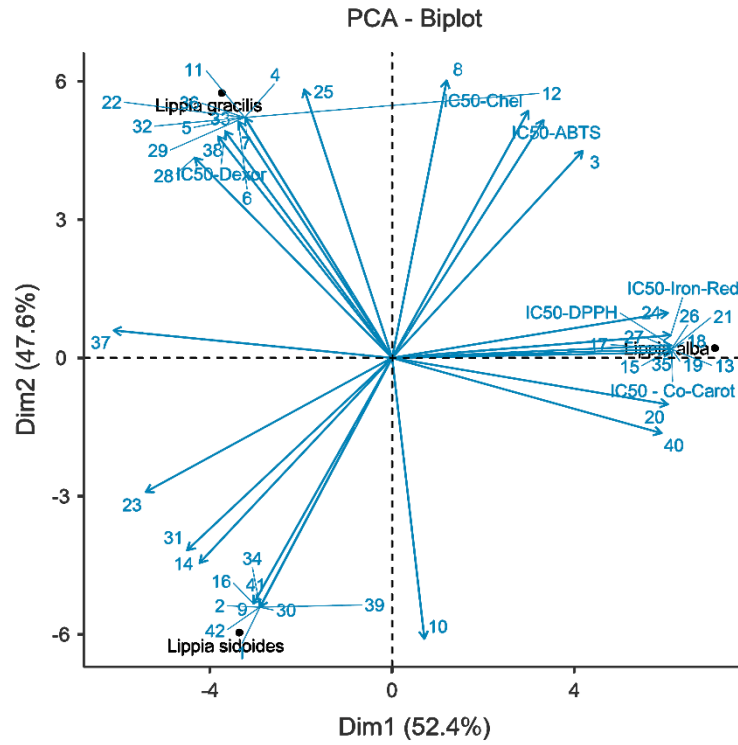
Sample	IC <sub>50</sub> (µg/mL)					
	DPPH	ABTS	Deoxyribose protection	Fe <sup>3+</sup> Reduction	Fe <sup>2+</sup> Chelation	Co-oxidation
<b>LaEO</b>	5,849±0.00 <sup>a</sup>	45.79±1.81 <sup>a</sup>	59.06±2.15 <sup>a</sup>	67.42±6.94 <sup>a</sup>	56.10±4.15 <sup>a</sup>	737±57.97 <sup>a</sup>
<b>LsEO</b>	377±34.04 <sup>b</sup>	5.22±0.08 <sup>b</sup>	42.53±5.06 <sup>a</sup>	50.05±1.90 <sup>b</sup>	22.74±5.49 <sup>b</sup>	69.08±0.28 <sup>b</sup>
<b>LgEO</b>	397±53.06 <sup>b</sup>	88.91±1.27 <sup>c</sup>	456±34.04 <sup>b</sup>	62.49±1.08 <sup>a</sup>	102±0.60 <sup>c</sup>	40.25±2.03 <sup>c</sup>
<b>Ascorbic Acid</b>	34.02±0.60 <sup>c</sup>	195±3.39 <sup>d</sup>	33.51±0.58 <sup>a</sup>	27.52±0.64 <sup>c</sup>	9.79±0.95 <sup>d</sup>	905±4.85 <sup>d</sup>

560 These results are expressed as mean ±SD (n=3). Means followed by different letters differ by  
 561 Tukey test with a P <0.05.

562



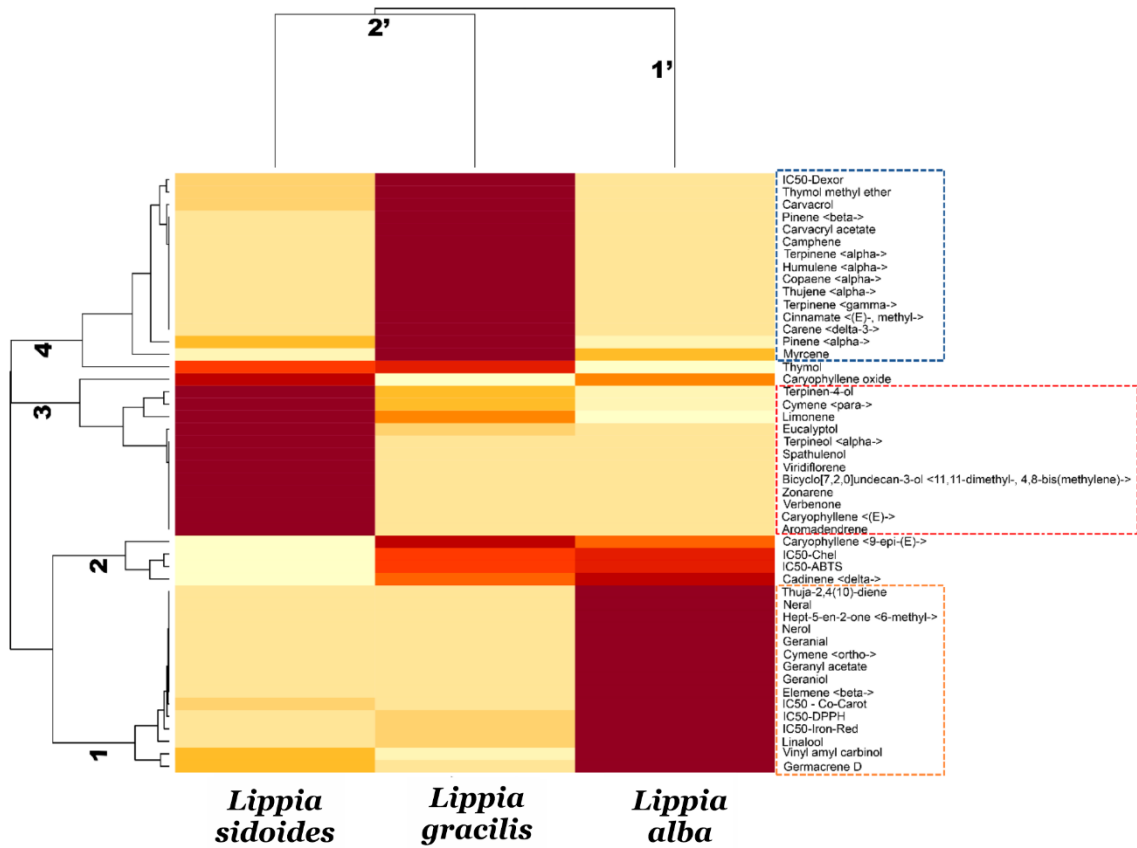
563 **Figure 1.** Antioxidant activity of the essential oils of *L. alba*, *L. sidoides* and *L. gracilis* by  
 564 different mechanisms. A: DPPH free radical scavenging; B: ABTS radical sequestration; C:  
 565 Deoxyribose protection; D: Fe<sup>3+</sup> reduction; E: Fe<sup>2+</sup> chelation; F: Inhibition of linoleic acid  
 566 degradation. Ascorbic acid was used as a standard antioxidant control. \*: P < 0.05. Data were  
 567 analyzed by ANOVA and Tukey's post hoc test.  
 568



569

570 **Figure 2.** Principal Component Analysis Biplot (Score e loading) showing correlations  
 571 between the chemical compositions and antioxidant activities of *Lippia L.* essential oils.

572



573

574 **Figure 3.** Heatmap cluster analysis of *Lippia* species and variables (chemical composition and  
575 antioxidant activity).

## CAPÍTULO 2

**Artigo 2:** Chemical characterization, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of *Lippia* L. species compared by chemometric calculations

**Autores:** Carla de Fatima Alves Nonato, Emerson Vinicius Silva de Melo, Cicera Janaine Camilo, Débora Odília Duarte Leite, Irwin Rose Alencar de Menezes, Joanda Paolla Raimundo e Silva, Josean Fachine Tavares, Daniela Ribeiro Alves, Selene Maia de Moraes, José Galberto Martins da Costa.

**Periódico:** Food Chemistry.

**Link:** -

**Qualis:** A1 (Percentil 94,76).

**Fator de Impacto (JCR):** 9,231.

**Situação:** Submetido.

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi comparar a composição química não-volátil e as atividades antioxidante e antiacetilcolinesterase de espécies do gênero *Lippia* usando cálculos quimiométricos. Os extratos foram caracterizados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e seu conteúdo fenólico foi quantificado. Os potenciais antioxidantes foram determinados por DPPH, ABTS, proteção da desoxirribose e  $\beta$ -caroteno, quelação e redução de ferro, e a atividade de inibição da acetilcolinesterase foi avaliada. Os dados foram relacionados por análises multivariadas. Os extratos apresentaram composições com relação baixa e compostos compartilhados, destacando a classe dos flavonoides. *L. alba* e *L. gracilis* apresentaram maior quantidade de fenóis e flavonoides, respectivamente. Todos os extratos mostraram atividade antioxidante significativa, especialmente *L. gracilis* com  $IC_{50}$  de  $0.59 \pm 0.08$   $\mu\text{g/mL}$  para quelante de  $\text{Fe}^{2+}$ , tendo também apresentado melhor inibição da acetilcolinesterase. Análises multivariadas mostraram a eficácia dos constituintes de *L. sidoides* na quelação de  $\text{Fe}^{2+}$ , redução do radical DPPH, proteção da desoxirribose e anti-AChE. Conclui-se que os resultados demonstram importantes atividades dos extratos, sendo necessário estudos que certifiquem as correlações com os compostos de *Lippia* e seu uso na conservação de alimentos.

**Palavras-chave:** *Lippia*; Flavonoids, Atividade antioxidante; anti-AChE; PCA; Quimiometria.



1 **Chemical characterization, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of *Lippia***  
2 ***L.* species compared by chemometric calculations**

3  
4 Carla de Fatima Alves Nonato<sup>a,b</sup>, Emerson Vinicius Silva de Melo<sup>b</sup>, Cicera Janaine Camilo<sup>b</sup>,  
5 Débora Odília Duarte Leite<sup>b</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>a,c</sup>, Joanda Paolla Raimundo e  
6 Silva<sup>d</sup>, Josean Fechine Tavares<sup>d</sup>, Daniela Ribeiro Alves<sup>e</sup>, Selene Maia de Moraes<sup>e</sup>, José Galberto  
7 Martins da Costa<sup>a,b,\*</sup>

8  
9 <sup>a</sup>Postgraduate Program in Biological Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional  
10 University of Cariri, Crato, CE 63105-000, Brazil.

11 <sup>b</sup>Research Laboratory of Natural Products, Department of Biological Chemistry, Regional  
12 University of Cariri, Crato, CE 63105-000, Brazil.

13 <sup>c</sup>Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Department of Biological Chemistry,  
14 Regional University of Cariri, Crato, CE 63105-000, Brazil.

15 <sup>d</sup>Multiuser Laboratory of Characterization and Analysis, Federal University of Paraíba, João  
16 Pessoa, PB 58051-900, Brazil.

17 <sup>e</sup>Chromatographic and Spectroscopic Analysis Laboratory, State University of Ceará,  
18 Fortaleza, CE 60714-903, Brazil.

19 <sup>\*</sup>Corresponding author at: Postgraduate Program in Biological Chemistry, Department of  
20 Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE 63105-000, Brazil.

21 E-mail address: [galberto.martins@urca.br](mailto:galberto.martins@urca.br) (J.G. Martins da Costa).

22  
23 **Abstract:** This work aimed to compare the non-volatile chemical composition and the  
24 antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of species of the *Lippia* genus using  
25 chemometric calculations. The extracts were characterized by HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> and their  
26 phenolics were quantified. Antioxidant potentials were determined by DPPH, ABTS,  
27 deoxyribose and  $\beta$ -carotene protection, iron chelation and reduction, and anti-  
28 acetylcholinesterase activity was evaluated. Data were related by multivariate analyses. The  
29 extracts showed compositions with low ratio and shared compounds, highlighting the  
30 flavonoids. *L. alba* and *L. gracilis* showed higher amounts of phenols and flavonoids,  
31 respectively. All extracts showed significant antioxidant activity, especially *L. gracilis* with  
32 IC<sub>50</sub> of 0.59±0.08  $\mu$ g/mL for Fe<sup>2+</sup> chelator, and also better acetylcholinesterase inhibition.  
33 Multivariate analyzes showed the efficacy of *L. sidoides* constituents in Fe<sup>2+</sup> chelation, DPPH  
34 reduction, deoxyribose protection and anti-AChE. The results demonstrate important activities

35 of the extracts, requiring studies to certify the correlations with *Lippia* compounds and their use  
36 in food preservation.

37 **Keywords:** Verbenaceae; Flavonoids, Antioxidant Activity; anti-AChE; PCA; Chemometrics.

38

### 39 **1. Introduction**

40

41 Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease,  
42 frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis are devastating disorders that  
43 inevitably progress to severe disability and death (Dawson et al., 2018). These can result from  
44 different pathogenic and metabolic mechanisms, such as mitochondrial dysfunction,  
45 excitotoxicity, neuroinflammation, oxidative stress, among others (Bernhardi & Eugén, 2012).

46 Oxidative stress, caused by high concentrations of reactive oxygen species (ROS), plays  
47 a critical role in neurodegenerative disorders, accentuating the progression of these conditions  
48 through oxidative damage and interaction with mitochondria (Liu et al., 2017). Furthermore,  
49 the degradation of cholinergic neurons reduces the availability of neurotransmitters important  
50 for memory processing, contributing to cognitive impairment in Alzheimer's disease (H. Khan  
51 et al., 2018).

52 In view of the etiology, pathophysiology and the reduced number of treatment options  
53 available for these disorders, the action of natural agents and plant extracts, as therapeutic  
54 alternatives alone or in combination with usual drugs, must be considered, especially  
55 phytochemicals abundant in different food sources, as they have underlying health effects  
56 associated with their consumption, such as phenolic compounds (Amato et al., 2019; Srivastava  
57 & Yadav, 2016).

58 Species of the *Lippia* L. genus are used worldwide as food, beverages, seasonings and  
59 in the treatment of diseases of the gastrointestinal and respiratory tracts, also acting as  
60 analgesics, anti-inflammatories and antipyretics (Ombito et al., 2014). Phytochemical studies  
61 show their richness of phenolic compounds, mainly phenylpropanoids and flavonoids, which  
62 have different biological activities, such as anti-inflammatory, antioxidant, neuroprotective,  
63 hypotensive, hepatoprotective, among others (Leyva-Jiménez et al., 2019).

64 The chemical diversity and complexity presented by plant extracts is related to the  
65 quality and abundance of their compounds, which have different polarities and can lead to  
66 dispersed bioactivity results. Despite this, chemometric analyzes are tools that provide the  
67 assessment of these variables and their interactions, facilitating the achievement of a single and  
68 global response for studies with multiple dependent variables (Diedrich et al., 2021).

69 This article proposes to offer continuity to the study of chemical composition-  
70 bioactivity correlation of species of the *Lippia* genus. Recently an article with this approach  
71 involving volatile chemical components was published by this research group (Nonato et al.,  
72 2022). This time, the work compares non-volatile chemical components and verifies their  
73 antioxidant and anti-acetylcholinesterase properties involving three species of this genus.

74

## 75 **2. Methodology**

76

### 77 *2.1. Plant material and extract obtention*

78 The leaves of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson (110 g) and *Lippia*  
79 *sidoides* Cham. (170 g) were collected in the Medicinal Plant Garden of the Regional University  
80 of Cariri (7°14'20.1" S 39°24'53.1" W) in January 2019 and an exsiccate of each species was  
81 deposited in the Herbarium Caririense Dárdano de Andrade Lima (HDCAL/ URCA) under  
82 identification numbers 13907 and 3038, respectively. *Lippia gracilis* Schauer leaves (1170 g)  
83 were collected in the Gisélia Pinheiro neighborhood, municipality of Crato, Ceará, Brazil  
84 (7°13'05.2" S 39°25'44.9" W) in May 2019, with an exsiccate deposited in the Herbarium Prisco  
85 Bezerra of Federal University of Ceará, with registration number 44456.

86 Fresh leaf extracts were obtained by exhaustive maceration in ethanol (99% for 72 h).  
87 The solutions obtained were concentrated in an evaporator at 50 °C under reduced pressure,  
88 obtaining a yield of 6.96%, 3.91% and 3.47% for the extracts of *L. alba* (LaEE), *L. sidoides*  
89 (LsEE) and *L. gracilis* (LgEE), respectively.

90

### 91 *2.2. Chemicals and solvents*

92 All chemicals were analytical grade. Chloroform (CHCl<sub>3</sub>), formic acid and methanol  
93 (MeOH) were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Hesse, Alemanha). Ascorbic acid,  
94 gallic acid, quercetin, acetylthiocholine iodide, Ellman's reagent, bovine serum albumin, 2,2-  
95 Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic Acid)  
96 (ABTS), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, Deoxyribose, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, trichloroacetic acid (TCA), thiobarbituric acid  
97 (TBA), FeCl<sub>3</sub>, Tris-HCl, *o*-phenanthroline (*o*-phe), linoleic acid, Tween 40, Folin-Ciocalteu,  
98 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K and  $\beta$ -carotene were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis,  
99 Missouri, USA).

100

### 101 *2.3. Chemical composition*

#### 102 *2.3.1. Quantification of total phenols*

103 The quantification of total phenols followed the Folin-Ciocalteu oxidation method  
104 proposed by Singleton et al. (1999). 25  $\mu$ L aliquots of the diluted extracts were added to Folin-  
105 Ciocalteu reagent (625  $\mu$ L, 10%) and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (500  $\mu$ L, 7.5%). Absorbances were measured in  
106 a spectrophotometer (Kasuki DR-200BS) at 765 nm after incubation for 15 min at 45 °C and  
107 protected from light. For the calibration curve, gallic acid was used as a standard and for the  
108 blank test, MeOH. The analysis was performed in triplicate and the results were expressed as  
109 mg equivalent of gallic acid per g of extract (mg GA/g Ext.).

110

### 111 2.3.2. *Quantification of total flavonoids*

112 The total flavonoid content was measured by the  $\text{AlCl}_3$  colorimetric method according  
113 to Kosalec et al. (2004). 1160  $\mu$ L aliquots of the diluted extracts were added to MeOH (760  
114  $\mu$ L),  $\text{AlCl}_3$  (40  $\mu$ L, 10%) and  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$  (40  $\mu$ L, 0.1 M). Absorbances were measured in a  
115 spectrophotometer at 415 nm after incubation for 30 min in the dark. Quercetin was used as a  
116 standard for the calibration curve and MeOH for the blank test. All analysis was performed in  
117 triplicate and results were expressed as mg quercetin equivalent per g of extract (mg QE/g Ext.).

118

### 119 2.3.3. *Analysis of compounds by HPLC-DAD-ESI-MSn*

120 The extracts were analyzed by Shimadzu HPLC, using a C18 analytical  
121 chromatographic column (Kromasil - 250 mm x 4.6 mm x 5  $\mu$ m), coupled to a mass  
122 spectrometer (Ion-Trap AmazonX, Bruker or microTOFII, Bruker), with Ionization by  
123 Electrospray (ESI). The samples were solubilized in MeOH (1 mg/mL), with subsequent  
124 filtration through PVDF (Polyvinylidene Fluoride) filters, with a mesh size of 0.5  $\mu$ m. The  
125 method used chromatographic grade MeOH (solvent B) and type I ultrapure  $\text{H}_2\text{O}$  (Milli-Q),  
126 acidified with formic acid (0.1%, v/v) (solvent A), in a concentration gradient (5 to 100% of B  
127 in 95 min). The injection volume was 10  $\mu$ L and the flow rate was 0.6 mL/min. In the mass  
128 spectrometer, the samples were submitted to a sequential fragmentation in MS3. The acquisition  
129 parameters in the Ion Trap and TOF were capillary 4.5 kV, final plate offset 500 V, nebulizer  
130 gas 35 psi, dry gas ( $\text{N}_2$ ) with flow of 8 mL/min and temperature of 300 °C. The sample was  
131 analyzed in negative ionization mode and the identification of compounds was based on data  
132 (MS/MS) reported in the literature.

133

## 134 2.4. *Antioxidant activity*

### 135 2.4.1. *DPPH free radical scavenging*

136 The assay followed the method proposed by Rufino et al. (2007). The concentrations of  
137 ethanolic extracts ranged from 5 to 1000  $\mu$ g/mL. For the assay, 20  $\mu$ L of the samples and the

138 DPPH radical (280  $\mu$ L, 0.06 mM) were used. After 30 min of reaction in the dark, readings  
 139 were performed in a spectrophotometer at 515 nm. As blank, positive control and negative  
 140 control, MeOH, ascorbic acid were used and the sample aliquot was replaced by solvent,  
 141 respectively. The results were calculated according to equation 1, where Abs means absorbance:

$$142 \quad AA\% = 100 - \left\{ \left[ \frac{(AbsSample - AbsBlank)}{AbsNegativeControl} \right] \times 100 \right\}$$

143

#### 144 2.4.2. ABTS free radical capture

145 The ABTS radical capture activity followed the methodology proposed by Rufino et al.  
 146 (2007). The concentrations evaluated ranged from 5 to 1000  $\mu$ g/mL. In a dark environment, 30  
 147  $\mu$ L aliquots of each concentration were transferred to test tubes with 3.0 mL of the ABTS  
 148 radical. The reading was performed in a spectrophotometer at 734 nm after 6 min of reaction  
 149 of the mixture. Ascorbic acid was used as a positive control and MeOH as a blank. The results  
 150 were obtained from equation 1.

151

#### 152 2.4.3. 2-Deoxyribose (2-DR) Oxidative Degradation Assay

153 The ability of ethanol extracts to inhibit deoxyribose degradation was measured by the  
 154 methodology of Puntel et al. (2005). The reaction mixture consisted of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (240  $\mu$ L, 0.8 mM),  
 155 FeSO<sub>4</sub> (240  $\mu$ L, 0.08 mM), potassium phosphate buffer (450  $\mu$ L, 7.5 mM, pH 7.4), deoxyribose  
 156 (150  $\mu$ L, 1.5 mM) and H<sub>2</sub>O (320  $\mu$ L). 100  $\mu$ L of sample concentrations (5 to 1000  $\mu$ g/mL) were  
 157 added to the reaction mixture and incubated at 37 °C for 60 min. After this period, TCA (750  
 158  $\mu$ L, 2.8%) and TBA (750  $\mu$ L, 0.8%) were added and incubated again at 100 °C for 20 min. The  
 159 negative control was obtained by the reaction in the absence of samples and the blank in the  
 160 absence of deoxyribose. After cooling, the reading was performed in a spectrophotometer at  
 161 532 nm and the results were expressed as percentage of protection by equation 2:

$$162 \quad \text{Protection 2 - DR (\%)} = \left\{ \frac{[AbsControl - (AbsSample - AbsBlank)]}{AbsControl} \right\} \times 100$$

163

#### 164 2.4.4. Fe<sup>2+</sup> Ion Chelator Assay and Fe<sup>3+</sup> Ion Reducing Power

165 The tests followed the method proposed by Minotti & Aust (1987), with some  
 166 modifications. 500  $\mu$ L aliquots of samples (5 to 500  $\mu$ g/mL) were mixed with FeSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ L,  
 167 1000  $\mu$ M) and FeCl<sub>3</sub> (500  $\mu$ L, 1000  $\mu$ M) separately. After 2 min of reaction, 50  $\mu$ L of this  
 168 mixture was added to 96-well plates containing a mix with Milli-Q water, Tris-HCl (0.1 M, pH  
 169 7.4) and o-phe (300  $\mu$ M). The controls for Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> were obtained by replacing the aliquots  
 170 of the samples with Milli-Q water and the blank contained only Milli-Q water and the respective

171 ferrous solutions. The reading was performed in a spectrophotometer at 510 nm and the results  
172 expressed as a percentage, according to equation 2. The results of the reducing power of  $\text{Fe}^{3+}$   
173 were expressed compared to the controls of  $\text{Fe}^{2+}$ .

174

#### 175 *2.4.5. Co-oxidation of $\beta$ -carotene/linoleic acid*

176 The assay followed the method of Rufino et al. (2006). In the preparation of the reaction  
177 mixture, linoleic acid (40  $\mu\text{L}$ ), Tween 40 (530  $\mu\text{L}$ ),  $\beta$ -carotene (50  $\mu\text{L}$ , 20 mg/mL) and  $\text{CHCl}_3$   
178 (1 mL) were added. After homogenization, the  $\text{CHCl}_3$  was evaporated followed by the addition  
179 of oxygenated Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$  until an absorbance between 0.6 nm and 0.7 nm at 470 nm was  
180 obtained. For the test, 250  $\mu\text{L}$  of this reaction mixture and 10  $\mu\text{L}$  of sample concentrations (5  
181 to 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) were added to each microplate well. For the blank and control, the aliquot of  
182 the mix and the sample, respectively, were replaced by Milli-Q water. Results were expressed  
183 as percentage of oxidation inhibition according to equation 2.

184

#### 185 *2.5. Acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity*

186 The inhibitory activity of the AChE enzyme followed the methodology described by  
187 Ellman et al. (1961). In 96-well plates, acetylthiocholine iodide (25  $\mu\text{L}$ , 15 mM), 125  $\mu\text{L}$  of  
188 5,5'-dithiobis-[2-nitrobenzoic] in Tris/HCL solution (50 nM, pH 8, with 0.1 M of NaCl and  
189 0.02 M  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 50  $\mu\text{L}$  of the Tris/HCl solution (50 nM, pH 8, with 0.1% bovine serum  
190 albumin-BSA), 25  $\mu\text{L}$  of the extract sample dissolved in MeOH were added and diluted 10  
191 times in the Tris/HCl solution (50 mM, pH 8) to obtain a final concentration of 2000  $\mu\text{g/mL}$ .  
192 The concentrations tested were 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200  $\mu\text{g/mL}$  and readings were taken  
193 at 405 nm for 30 s. Then, AChE (25  $\mu\text{L}$ , 0.25 U/mL) was added, and the absorbance was  
194 measured immediately and after 15 and 30 min. As a negative standard, all solutions were used,  
195 except the sample. The percentage of AChE inhibition was calculated by comparing the  
196 hydrolysis rates of the substrate of the samples in relation to the blank (assuming a total of  
197 100% AChE activity).

198

#### 199 *2.6. Statistical analysis*

200 The values obtained in the antioxidant assays were expressed as mean  $\pm$  standard  
201 deviation of three sample replicates ( $n = 3$ ). For antioxidant and anti-AChE activities analysis,  
202 after data normalization, a non-linear regression was applied to obtain the  $\text{IC}_{50}$  values. Then,  
203 ANOVA and Tukey's test were applied for multiple comparisons between pairs. The GraphPad  
204 Prism software version 8.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA)  
205 was used in all analyzes and results with a  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

206 Principal Component Analysis (PCA), Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Pearson's  
207 correlation test were used to compare the composition of extracts among the three species, as  
208 well as to correlate them with their antioxidant and anti-AChE activities. Multivariate analyzes  
209 were performed using Jamovi software version 1.6.16 (Jamovi Project, Sydney, Australia).

210

### 211 **3. Results and Discussion**

212

#### 213 *3.1. Chemical composition*

214 All ethanol extracts were essentially rich in phenolic compounds, as shown in Table S1  
215 (See Supplementary Materials) and their main structures in Figure 1. LaEE showed a greater  
216 diversity of compounds, containing 5 iridoids, 1 phenylethanoid glycoside, 1 oxylipin, 1 fatty  
217 acid and 11 flavonoids. While LsEE and LgEE presented only flavonoids, with 12 and 15  
218 compounds, respectively, some compounds were identified in more than one sample, such as  
219 Emodin-8-*O*-glycoside (6) in LaEE and LsEE, Luteolin-6-*O*-glycoside (14), Eriodictiol (7) and  
220 Luteolin (13) in LsEE and LgEE, and the flavonoids Naringenin (16) and Cirsimaritin (5)  
221 present in all studied extracts.

222 Iridoid glycosides are secondary metabolites known to be found in species of the  
223 Verbenaceae family (Hussain et al., 2019). In ethanolic and methanolic extracts from *L. alba*  
224 leaves, the presence of Geniposidic acid (8) and Shanzhiside methyl ester (19) were reported  
225 (Gomes et al., 2019; Hennebelle et al., 2008). On the other hand, for the compounds  
226 Monotropein (15), Loganic acid (11) and Loganin (12) this is the first report for extracts of this  
227 species. Commonly, 8-epi-Loganin is found in different extracts of *L. alba*, which is a  
228 stereoisomer of Loganin (Gomes et al., 2019; Hennebelle et al., 2008; Timóteo et al., 2015).  
229 The difference in composition between individuals of the same species may be linked to the  
230 variation of abiotic factors to which they are subjected, such as temperature, humidity,  
231 precipitation, among others (Li et al., 2020).

232 Acteoside (1), also called Verbacoside, is a phenylethanoid glycoside already found in  
233 extracts of *L. alba* (Gomes et al., 2019; Trevisan et al., 2016). It is recognized for its biological  
234 activities, such as anticonvulsant, antiparkinsonian, cytotoxic, hypotensive, anticancer,  
235 antioxidant, etc. (R. A. Khan et al., 2022). Tuberonic acid glycoside (22), on the other hand,  
236 was only seen in extracts of *L. graveolens* Kunth and *L. citriodora* (Palau) Kunth (Cortés-  
237 Chitala et al., 2021; Leyva-Jiménez et al., 2019), this being the first report in *L. alba*.

238 The chemical compositions of the ethanolic extract of *Lippia* species showed an  
239 abundance of secondary metabolites of the flavonoids class (Leyva-Jiménez et al., 2019),  
240 corroborating with the results of this study. This essential ingredient present in a variety of

241 nutraceutical products has been studied exhaustively due to its antioxidant properties that can  
242 be used to prevent damage caused by oxidative stress and generation of free radicals through  
243 scavenging of ROS (Shen et al., 2022).

244 The flavonoids Apigenin-7-*O*-glucuronide (3), Tricin-7-*O*-glucuronide (21),  
245 Isorhamnetin (10) and Naringenin appear in different extracts of *L. alba* (Gomes et al., 2019;  
246 Oliveira et al., 2018; Trevisan et al., 2016). As well as Taxifolin (20), Luteolin, Naringenin and  
247 Apigenin (2) in *L. sidoides* (Funari et al., 2012) and Naringenin, Quercetin (18), Orientin (17)  
248 and iso-Orientin (9) in *L. gracilis* (Moraes et al., 2018). The di-glycosylated form of the flavone  
249 Chrysoeriol (4) has also been reported for *L. alba* (Timóteo et al., 2015).

250 Among the flavonoids identified, Naringenin and Cirsimaritin were found in the three  
251 extracts studied, which were reported in the species *L. salviifolia* Cham., *L. velutina* Schauer,  
252 *L. balansae* Briq., *L. lupulina* Cham., *L. graveolens* Kunth, *L. citriodora* (Palau) Kunth, *L.*  
253 *javanica* (Burm.f.) Spreng., *L. chevalieri* Moldenke and *L. lacunosa* Mart. & Schauer (Bangou  
254 et al., 2012; Castellar et al., 2011; Cortés-Chitala et al., 2021; Funari et al., 2012; Leyva-  
255 Jiménez et al., 2019; Ombito et al., 2014). Thus, we suggest that these flavonoids can be  
256 considered chemical markers for the genus. The use of these markers for medicinal plants is  
257 essential considering that bioactivities can, in most cases, be related to a specific chemotype  
258 (Almeida et al., 2018). Figure S1 shows the proposed fragmentations for Naringenin and  
259 Cirsimaritin.

260 The results show LaEE with a significantly higher content of total phenolics of  
261  $30.11 \pm 1.24$  mg GA/g Ext., followed by LgEE and LsEE (Table 1). Studies show high phenolic  
262 content for ethanolic, methanolic and aqueous extracts of *L. alba* leaves with  $117.78 \pm 2.69$ ,  
263  $367.49 \pm 38.90$  and  $505.11 \pm 2.55$   $\mu$ g GAE/g dry weight, respectively (Dubey et al., 2020).  
264 Garmus et al. (2015), studying the influence of different types of extraction on the phenolic  
265 composition of *L. sidoides*, obtained contents ranging between  $38.20 \pm 0.06$  and  $230.5 \pm 0.1$   
266 mg GAE/g extract.

267 In terms of total flavonoids, LgEE had the highest rate of these compounds with  
268  $8.76 \pm 0.27$  mg QE/g Ext., followed by LsEE and LaEE (Table 1). However, these contents were  
269 lower than those obtained for different extracts of *L. sidoides*, with  $43.5 \pm 0.3$  to  $262.3 \pm 0.4$   
270 mg EC/g extract, and of *L. alba*, with  $371.33 \pm 4.50$  to  $463.94 \pm 6.49$  g QE/gm dry weight (Dubey  
271 et al., 2020; Garmus et al., 2015). Many studies consider the influence of genetic, abiotic  
272 factors, seasonality and type of extraction on the composition of a species (Shen et al., 2022).

273 The results show that total flavonoid content is equivalent to 93.23%, 88.75% and  
274 23.21% of the total phenolic values obtained for LsEE, LgEE and LaEE, respectively. These  
275 percentages agree with the compositions identified in the HPLC-DAD-ESI-MSn analysis.



276 Many studies presented in the literature data, with chemical compositions similar to those  
277 presented in this manuscript, have reported the significant antioxidant activity of *L. alba*, *L.*  
278 *gracilis* and *L. sidoides* (Garmus et al., 2015; Moraes et al., 2018; Trevisan et al., 2016).

279

### 280 3.2. Antioxidant activity

281 The extracts exerted DPPH free radical scavenging activity, with percentages of  
282 maximum inhibition of 63.49%, 92.93% and 87.85% for LaEE, LsEE and LgEE, respectively,  
283 but showed lower activity than ascorbic acid, which obtained a percentage of 96.66%, as shown  
284 in Figure 2a. Despite differing in their inhibition percentages, their IC<sub>50</sub> did not differ  
285 statistically from each other (Table 1). As for the capture of the ABTS radical, LaEE reached  
286 only 27.21% inhibition, demonstrating low activity against this radical. LsEE and LgEE  
287 reached percentages of 97.99% and 65.91%, exhibiting moderate activity (Figure 2b), with all  
288 IC<sub>50</sub>s differing statistically (Table 1).

289 The free radical scavenging action of flavonoids depends on their chemical structure  
290 and can follow two pathways of action that include hydrogen atom transfer (HAT) and single  
291 electron transfer (SET). Apigenin follows both pathways, via the 4-hydroxyl group on its B  
292 ring, which donates its hydrogen and electron atom, and the m-5,7-dihydroxy arrangements on  
293 the A ring and the 4-oxo group on the C ring, which are responsible for the delocalization of  
294 electrons from the B ring (Kashyap et al., 2022).

295 For the OH• radical reduction activity, the extracts showed moderate activity, except for  
296 LsEE, which showed a greater ability to protect deoxyribose than the positive control with a  
297 percentage of 89.85% (Figure 2C). As for IC<sub>50</sub>, LaEE and ascorbic acid did not differ  
298 statistically, demonstrating the same effectiveness (Table 1). These values are similar to those  
299 obtained by the aqueous and ethanolic extracts of *L. alba* leaves, with IC<sub>50</sub> of 33.36±0.47 and  
300 39.31±0.28 µg/ml, respectively (Dubey et al., 2020). The authors relate these values to the  
301 phenolic content present in the extracts.

302 For the reduction of Fe<sup>3+</sup> ion (Figure 2D), all extracts showed a percentage above 90%,  
303 showing greater effectiveness than the positive control (86.9%), not having their IC<sub>50</sub>  
304 statistically differed (Table 1). The isolated flavonoids isovitexin and quercetin and kaempferol  
305 derivatives showed potential to reduce the Fe<sup>3+</sup> ion, which suppresses the formation of ROS by  
306 the Fenton reaction, and inhibit the AChE enzyme, showing potential for their uses for the  
307 treatment of Alzheimer's disease (Ndhlala et al., 2013).

308 As for the Fe<sup>2+</sup> chelator test (Figure 2E), the three extracts showed greater efficiency in  
309 chelating this ion than ascorbic acid, except at the concentration of 25 µg/mL for LaEE and  
310 LsEE. The presented IC<sub>50</sub>s were also lower than the positive control, especially those obtained

311 by LaEE and LgEE, with 1.29 and 0.59  $\mu\text{g/mL}$  (Table 1). This result may be related to the  
312 structure of the flavonoids present in these extracts, as they have proximal hydroxyl groups (o-  
313 dihydroxyl group in the B or A ring), 3-hydroxy-4-keto group in the C ring, or the 5-hydroxy-  
314 4-keto position of the A and C rings that are responsible for the chelation sites of metals, such  
315 as apigenin, luteolin and erydictiol (Kashyap et al., 2022; Shen et al., 2022).

316 All extracts were able to inhibit linoleic acid peroxidation, reaching a percentage greater  
317 than 90%, differing from ascorbic acid, which obtained only 55.91%, having lower activity than  
318 the extracts at all concentrations tested (Figure 2F). Of the  $\text{IC}_{50}$  obtained, the LsEE showed  
319 greater efficacy, with 6.65  $\mu\text{g/mL}$ , while the others did not differ statistically. Su et al. (2022)  
320 demonstrated the efficacy of phlorizin in scavenging radicals formed by lipid peroxidation and  
321 its action in increasing the activity of antioxidant enzymes by T-AOC, SOD and GSH-PX in  
322 the hippocampus of mice.

323

### 324 3.3. AChE inhibitory activity

325 The curve of the inhibitory activity of AChE by the ethanolic extracts is represented in  
326 Figure 3, showing that the inhibitory capacity of the samples continues with the increase of the  
327 concentration regardless of the elapsed reaction time. LgEE showed lower inhibition capacity,  
328 reaching only 52% at the three times studied. On the other hand, LaEE and LgEE showed  
329 moderate activity of inhibition, with maximum percentages of 72.2% and 75.4%, respectively.  
330 The  $\text{IC}_{50}$  obtained did not vary statistically between the extracts, however, they still showed  
331 concentrations above the positive control of Physotigmine (Table 1).

332 Acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) are used for the treatment of alterations of  
333 cholinergic functions such as myasthenia gravis and Alzheimer's disease. A large number of  
334 flavonoids have demonstrated an AChE inhibition potential, as for example, 2',4'-dihydroxy-  
335 6'methoxy-3',5'-dimethyl-dihydrochalcone, quercetin, luteolin-7-O-rutinoside, isorhamnetin  
336 and others (H. Khan et al., 2018). Furthermore, Vanzolini et al. (2018) demonstrated that  
337 eriodictyol 2' or 3'-O-glucoside as a ligand for acetylcholinesterase.

338 Others studies also show that the Phloridzin derived, as 3-Hydroxyphlorizin, has a  
339 significant anti-AchE potential (Su et al., 2022). Apigenin shows a potential anti-AchE to be  
340 the most effective agent by in silico assay, suggesting that the main intermolecular interaction  
341 is a hydrophobic association, although hydrogen bonds between flavonoids and revealing the  
342 importance of hydroxyl positions in flavonoids seem to be of utmost importance for  
343 acetylcholinesterase inhibition (Sarkar et al., 2021).

344

### 345 3.4. Multivariate analysis

346 The use of statistical tools helped the authors to predict the association between  
347 biological and pharmacological properties and the chemical components. The multivariate  
348 principal component analysis (PCA) is used to better understand the relationship among the  
349 studied variables (chemical compositions and biological properties), while Pearson's correlation  
350 coefficient was used to determine the relations between the variables.

351 The PCA analysis identifies the most differentiating variables providing data sets of all  
352 variables to discriminate among the *Lippia* extracts and the correlations among these variables  
353 (chemical compositions and biological data). These results of the PCA were presented in terms  
354 of both score and loading plots (Biplot) present in figure 4, showing that the two first principal  
355 components (PCs) account for the full totality of the cumulative percentage of total variations,  
356 and PC1 and PC2 accounted for 57.2% and 42.8% of the variance, respectively and, the arrow  
357 vector indicating the contribution of variables to PC1 and PC2. A negative value of PC1 was  
358 correlated with IC<sub>50</sub> for DPPH, Desoxyribose assay, Chelating, or capacity of iron reduction  
359 and anti-AchE, whereas the loadings on PC2 specified high contributions from ABTS and Co-  
360 oxidation assay. It's observed a clear separation of the different extracts of *Lippia* in quadrant  
361 PC1+ and PC2- for the LaEE with variables contributed mostly ABTS, whereas, in quadrant  
362 PC1- and PC2+ for the LsEE with variables contributed mostly Acetylcholinesterase inhibition,  
363 DPPH, Desoxiribose assay, Chelating Fe<sup>2+</sup> assay and compounds 7, 11, 20, and 21. The LsEE  
364 it's observed in quadrants PC1- and PC2- with the capacity of Reduction of Fe<sup>3+</sup> and compounds  
365 24, 12, and 33 as variables with the most contribution.

366 Based on the composition of different ethanolic extract, antioxidant activities and  
367 Acetylcholinesterase inhibition potential showed a significant variation, however, in the  
368 heatmaps it's observed a significant separation among ethanolic extract of *Lippia* species. The  
369 colour present in the heatmap indicated the higher significance in the red color, whereas orange  
370 and yellow colours it's indicative of the lower significance. The Figure 5 shows that LsEE 2  
371 have higher abundance of the compounds 1, 3, 7, 11, 13, 20, 21, 22 and 27 that are strongly  
372 correlated with antioxidant and AChE inhibition potential. Similarly, for the LaEE it's observed  
373 that capacity of Reduction of Fe<sup>3+</sup> present a significant correlation with the compounds 12, 24  
374 and 33, whereas the LgEE present a significant correlation of ABTS with higher abundance of  
375 compounds.

376 Pearson's correlation test shows that ABTS strongly correlated with Acteoside,  
377 Apigenin-7-*O*-glucuronide, Chrysoeriol, Dihydroxy-tetramethoxy flavone, Geniposidic acid,  
378 Isorhamnetin, Loganic acid, Loganin, Monotropein, Oxo-dihydroxy-octadecenoic acid,  
379 Quercetagetin-dimethyl-*O*-hexoside, Shanzhiside methyl ester, Tricin, Tricin 7-*O*-glucuronide,  
380 Tuberonic acid glucoside. The Dexoribose assay and Chelant assay show strongly correlations

381 with 3-Hydroxyphlorizin, Apigenin, Eriodictyol, Luteolin, Luteolin-7-*O*-rutinose, Phloridzin  
382 and DPPH assay. The Reduction of Fe<sup>3+</sup> show strong correlations with Apigenin-6,8-*C*-  
383 diglucoside, Dihydrokaempferol, Iso-orientin, Isovitexin, Orientin, Pinocembrin, Quercetin,  
384 Sakuranetin, Vitexin. The Pearson's correlation also strong correlation of acetylcholinesterase  
385 activity with 3-Hydroxyphlorizin, Apigenin, Emodin-8-*O*-glicoside, Eriodictyol-7-*O*-glicoside,  
386 Luteolin-7-*O*-rutinose, Phloridzin. Then, the PCA, correlation, and statistical clustering  
387 methods combining the antioxidant data and chemical composition present in this study indicate  
388 that the LsEE might be suitable to act as a drug with the potential for the treatment of alterations  
389 of cholinergic functions as myasthenia gravis and Alzheimer's disease.

390

#### 391 **4. Conclusion**

392

393 The present work showed the relationship between the non-volatile chemical  
394 composition and the antioxidant and anti-AChE activities of species of the *Lippia* genus from  
395 Cariri Ceará. The chemical components of the extracts were little related, but shared relevant  
396 compounds. Among these, the flavonoids naringenin and cirsimaritin present in the three  
397 extracts indicate the possibility of a chemical marker for the genus. The samples showed  
398 significant antioxidant and anti-AChE activities, especially the extract of *L. sidoides*, and this  
399 action is linked to the chemical structure of flavonoids and other compounds present in their  
400 compositions. The multivariate analyzes showed the relationship of *L. alba* compounds with  
401 the capture of the ABTS radical and those of *L. gracilis* with the reduction of the Fe<sup>3+</sup> ion. In  
402 contrast, the chelating actions of Fe<sup>2+</sup>, reduction of the DPPH radical, protection of deoxyribose  
403 and anti-AChE are related to the constituents of *L. sidoides*. Furthermore, the inhibition of  
404 linoleic acid peroxidation showed an intermediate relationship with the composition of *L. alba*  
405 and *L. sidoides*. Finally, the species studied show potential for studies that can elucidate the  
406 mechanisms involved in the actions presented and that seek to show their effectiveness in the  
407 treatment of neurodegenerative diseases and their potential as additives and preservatives in  
408 food systems.

409

#### 410 **CRedit authorship contribution statement**

411 **Carla de Fatima Alves Nonato:** Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Writing –  
412 original draft. **Emerson Vinicius Silva de Melo:** Investigation. **Cicera Janaine Camilo:**  
413 Investigation. **Débora Odília Duarte Leite:** Investigation. **Irwin Rose Alencar de Menezes:**  
414 Formal analysis, Writing – review & editing. **Joanda Paolla Raimundo e Silva:** Investigation.  
415 **Josean Fechine Tavares:** Investigation, Writing – review & editing. **Daniela Ribeiro Alves:**

416 Investigation. **Selene Maia de Moraes**: Investigation, Writing – review & editing. **José**  
417 **Galberto Martins da Costa**: Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision.

418

#### 419 **Declaration of Competing Interest**

420 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal  
421 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

422

#### 423 **References**

424 Almeida, M. C., Pina, E. S., Hernandez, C., Zingaretti, S. M., Taleb-Contini, S. H., Salimena,  
425 F. R. G., Slavov, S. N., Haddad, S. K., França, S. C., Pereira, A. M. S., & Bertoni, B. W.  
426 (2018). Genetic diversity and chemical variability of *Lippia* spp. (Verbenaceae). *BMC*  
427 *Research Notes*, *11*, 725. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3839-y>

428 Amato, A., Terzo, S., & Mulè, F. (2019). Natural compounds as beneficial antioxidant agents  
429 in neurodegenerative disorders: A focus on Alzheimer's disease. *Antioxidants*, *8*, 608–  
430 623. <https://doi.org/10.3390/antiox8120608>

431 Bangou, M. J., Abarca, N. A., Nâg-Tiero, M. R., Mouhibatou, Y. Z., Jeanne, M. R., &  
432 Germaine, N. O. (2012). *Lippia chevalieri* Moldenke: a brief review of traditional uses,  
433 phytochemistry and pharmacology. *International Journal of Drug Delivery*, *4*(3), 289–  
434 296. <https://doi.org/10.5138/ijdd.v4i3.795>

435 Bernhardt, R. V., & Eugenín, J. (2012). Alzheimer's disease: Redox dysregulation as a common  
436 denominator for diverse pathogenic mechanisms. *Antioxidants and Redox Signaling*,  
437 *16*(9), 974–1031. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4082>

438 Castellar, A., Coelho, T. S., Silva, P. E. A., Ramos, D. F., Lourenço, M. C. S., Lage, C. L. S.,  
439 Julião, L. S., Barbosa, Y. G., & Leitão, S. G. (2011). The activity of flavones and oleanolic  
440 acid from *Lippia lacunosa* against susceptible and resistant Mycobacterium tuberculosis  
441 strains. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *21*(5), 835–840.  
442 <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000076>

443 Cortés-Chitala, M. C., Flores-Martínez, H., Orozco-Ávila, I., León-Campos, C., Suárez-Jacobo,  
444 Á., Estarrón-Espinosa, M., & López-Muraira, I. (2021). Identification and Quantification  
445 of Phenolic Compounds from Mexican Oregano (*Lippia graveolens* HBK) Hydroethanolic  
446 Extracts and Evaluation of Its Antioxidant Capacity. *Molecules*, *26*, 702.  
447 <https://doi.org/10.3390/molecules26030702>

448 Dawson, T. M., Golde, T. E., & Lagier-Tourenne, C. (2018). Animal models of  
449 neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, *21*(10), 1370–1379.  
450 <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0236-8>

- 451 Diedrich, C., Silva, L. D., Sari, R., Borges, G. C. C., Muniz, H. S., Lima, V. A., Oldoni, T. L.  
452 C., & Carpes, S. T. (2021). Bioactive compounds extraction of *Croton lechleri* barks from  
453 Amazon forest using chemometrics tools. *Journal of King Saud University - Science*,  
454 33(4), 101416. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101416>
- 455 Dubey, S., Ojha, K., Chandrakar, J., Dehariya, R., Vinodia, S., Singh, A., & Dixit, A. K. (2020).  
456 Assessment of total phenolic content and antioxidant potentiality of selected Indian folk  
457 medicinal plants by spectrophotometric method. *Plant Science Today*, 7(3), 383–390.  
458 <https://doi.org/10.14719/pst.2020.7.3.765>
- 459 Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid  
460 colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*,  
461 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- 462 Funari, C. S., Eugster, P. J., Martel, S., Carrupt, P. A., Wolfender, J. L., & Silva, D. H. S.  
463 (2012). High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass  
464 spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia*  
465 species. *Journal of Chromatography A*, 1259, 167–178.  
466 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.069>
- 467 Garmus, T. T., Paviani, L. C., Queiroga, C. L., & Cabral, F. A. (2015). Extraction of phenolic  
468 compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction  
469 in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. *The Journal*  
470 *of Supercritical Fluids*, 99, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.01.016>
- 471 Gomes, A. F., Almeida, M. P., Leite, M. F., Schwaiger, S., Stuppner, H., Halabalaki, M.,  
472 Amaral, J. G., & David, J. M. (2019). Seasonal variation in the chemical composition of  
473 two chemotypes of *Lippia alba*. *Food Chemistry*, 273, 186–193.  
474 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.089>
- 475 Hennebelle, T., Sahpaz, S., Gressier, B., Joseph, H., & Bailleul, F. (2008). Antioxidant and  
476 neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba*. *Phytotherapy*  
477 *Research*, 22, 256–258. <https://doi.org/10.1002/PTR.2266>
- 478 Hussain, H., Green, I. R., Saleem, M., Raza, M. L., & Nazir, M. (2019). Therapeutic Potential  
479 of Iridoid Derivatives: Patent Review. *Inventions*, 4, 29.  
480 <https://doi.org/10.3390/INVENTIONS4020029>
- 481 Kashyap, P., Shikha, D., Thakur, M., & Aneja, A. (2022). Functionality of apigenin as a potent  
482 antioxidant with emphasis on bioavailability, metabolism, action mechanism and *in vitro*  
483 and *in vivo* studies: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 46, 1–23.  
484 <https://doi.org/10.1111/jfbc.13950>
- 485 Khan, H., Marya, Amin, S., Kamal, M. A., & Patel, S. (2018). Flavonoids as

- 486 acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects.  
487 *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 101, 860–870.  
488 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.007>
- 489 Khan, R. A., Hossain, R., Roy, P., Jain, D., Saikat, A. S. M., Shuvo, A. P. R., Akram, M.,  
490 Elbossaty, W. F., Khan, I. N., Painuli, S., Semwal, P., Rauf, A., Islam, M. T., & Khan, H.  
491 (2022). Anticancer effects of acteoside: Mechanistic insights and therapeutic status.  
492 *European Journal of Pharmacology*, 916, 174699.  
493 <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174699>
- 494 Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., & Vladimir-Knezević, S. (2004). Quantitative analysis  
495 of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica*, 54(1), 65–  
496 72.
- 497 Leyva-Jiménez, F. J., Lozano-Sánchez, J., Cádiz-Gurrea, M. L., Arráez-Román, D., & Segura-  
498 Carretero, A. (2019). Functional ingredients based on nutritional phenolics. A case study  
499 against inflammation: *Lippia* genus. *Nutrients*, 11(7), 1646.  
500 <https://doi.org/10.3390/nu11071646>
- 501 Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and  
502 environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and*  
503 *Biochemistry*, 148, 80–89. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2020.01.006>
- 504 Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A. C., Dimitrion, P., & Zuo, L. (2017). Oxidative Stress in  
505 Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications.  
506 *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2525967.  
507 <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2017/2525967>
- 508 Minotti, G., & Aust, S. D. (1987). An investigation into the mechanism of citrate Fe<sup>2+</sup>-  
509 dependent lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 3(6), 379–387.  
510 [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(87\)90016-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(87)90016-5)
- 511 Moraes, V. R. S., Nogueira, P. C. L., Costa, E. V., Santos, L. S., Silva, V. R., Bomfim, L. M.,  
512 & Bezerra, D. P. (2018). Phytochemical and Biological Properties of *Lippia gracilis*. In  
513 M. S. Akhtar & M. K. Swamy (Eds.), *Anticancer plants: Properties and Application* (Vol.  
514 1, pp. 37–55). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-8548-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8548-2_2)
- 515 Ndhlala, A., Aderogba, M., Ncube, B., & Staden, J. V. (2013). Anti-Oxidative and  
516 Cholinesterase Inhibitory Effects of Leaf Extracts and Their Isolated Compounds from  
517 Two Closely Related *Croton* Species. *Molecules*, 18, 1916–1932.  
518 <https://doi.org/10.3390/molecules18021916>
- 519 Nonato, C. F. A., Camilo, C. J., Leite, D. O. D., Nobrega, M. G. L. A., Ribeiro-Filho, J.,  
520 Menezes, I. R. A., Tavares, J. F., & Costa, J. G. M. (2022). Comparative Analysis of

- 521 Chemical Profiles and Antioxidant Activities of Essential Oils Obtained from Species of  
522 *Lippia* L. by Chemometrics. *Food Chemistry*, 384(February), 132614.  
523 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132614>
- 524 Oliveira, G. T., Ferreira, J. M. S., Lima, W. G., Alves, L. F., Duarte-Almeida, J. M., & Lima,  
525 L. A. R. S. (2018). Phytochemical characterisation and bioprospection for antibacterial  
526 and antioxidant activities of *Lippia alba* Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae).  
527 *Natural Product Research*, 32(6), 723–731.  
528 <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1335727>
- 529 Ombito, J. O., Salano, E. N., Yegon, P. K., Ngetich, W. K., & Mwangi, E. M. (2014). A review  
530 of the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). *Journal of*  
531 *Scientific and Innovative Research*, 3(4), 460–466.
- 532 Puntel, R. L., Nogueira, C. W., & Rocha, J. B. T. (2005). Krebs cycle intermediates modulate  
533 thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain in vitro.  
534 *Neurochemical Research*, 30(2), 225–235. <https://doi.org/10.1007/s11064-004-2445-7>
- 535 Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Mancini-Filho, J., & Moreira, A. V. B. (2006).  
536 Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no  
537 Sistema  $\beta$ -caroteno/Ácido Linoléico. In *Comunicado Técnico on line* (Vol. 126).
- 538 Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G. G., Pérez-jiménez,  
539 J., & Saura-Calixto, F. D. (2007). Metodologia Científica : Determinação da Atividade  
540 Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. In *Comunicado*  
541 *Técnico on line* (Vol. 127).
- 542 Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G. G., Pérez-jiménez,  
543 J., & Saura-Colixto, F. D. (2007). Metodologia Científica : Determinação da Atividade  
544 Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS.+. In *Comunicado*  
545 *Técnico on line* (Vol. 127).
- 546 Sarkar, B., Alam, S., Rajib, T. K., Islam, S. S., Araf, Y., & Ullah, M. A. (2021). Identification  
547 of the most potent acetylcholinesterase inhibitors from plants for possible treatment of  
548 Alzheimer's disease: a computational approach. *Egyptian Journal of Medical Human*  
549 *Genetics*, 22, 10. <https://doi.org/10.1186/s43042-020-00127-8>
- 550 Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., & Jin, B. (2022). Plant flavonoids:  
551 Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 383,  
552 132531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>
- 553 Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols  
554 and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.  
555 *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)



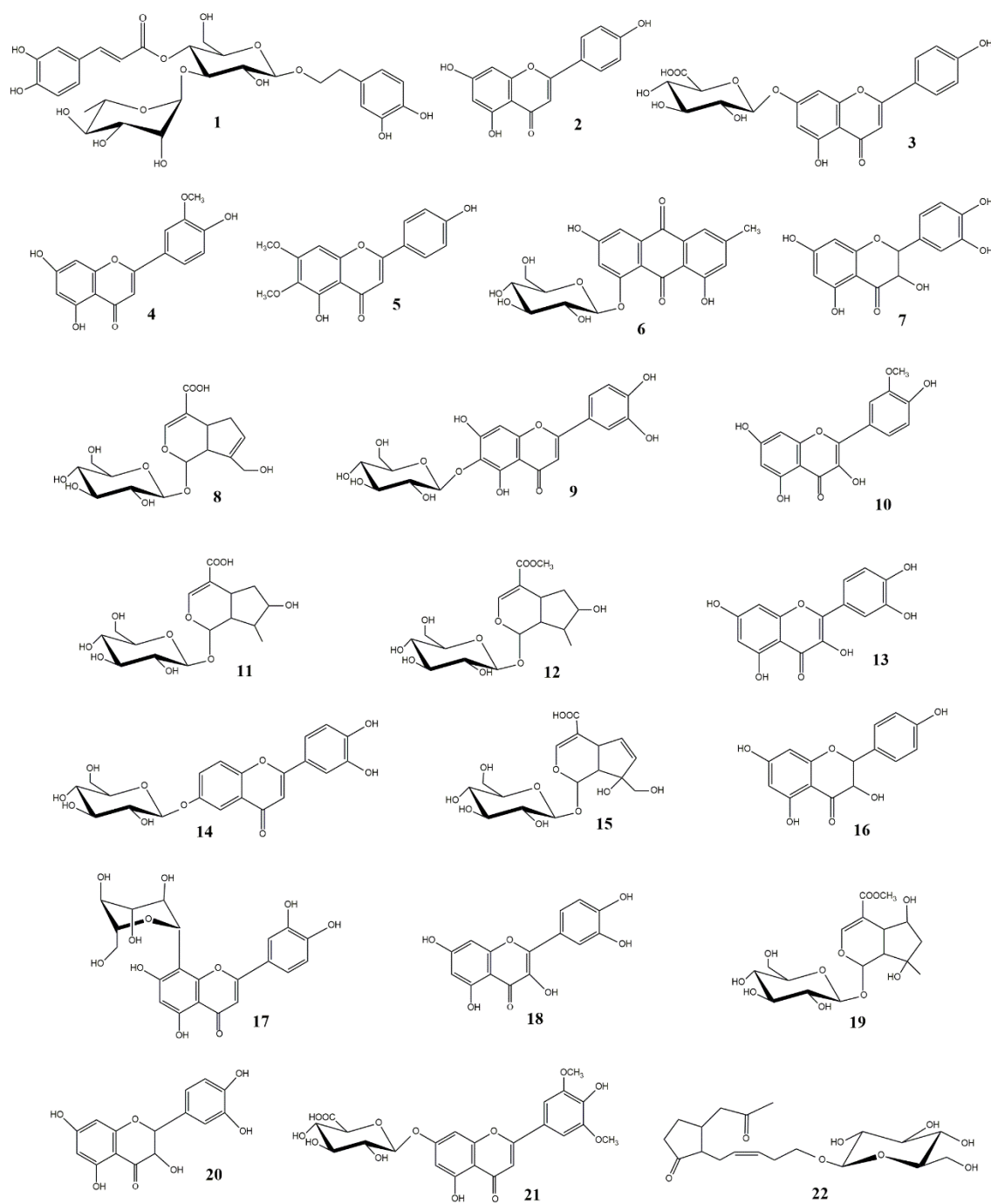
- 556 Srivastava, P., & Yadav, R. S. (2016). Efficacy of natural compounds in neurodegenerative  
557 disorders. In M. Essa, M. Akbar, & G. Guillemin (Eds.), *The Benefits of Natural Products*  
558 *for Neurodegenerative Diseases* (Vol. 12, pp. 107–123). Springer.  
559 [https://doi.org/10.1007/978-3-319-28383-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28383-8_7)
- 560 Su, Y. L., Liu, D., Liu, Y. J., Ji, Y. L., Liu, G. S., Wang, J. L. T., Wang, B., & Wang, H. (2022).  
561 Phlorizin alleviates cholinergic memory impairment and regulates gut microbiota in *d*-  
562 galactose induced mice. *Experimental Gerontology*, *165*, 111863.  
563 <https://doi.org/10.1016/j.exger.2022.111863>
- 564 Timóteo, P., Karioti, A., Leitão, S. G., Vincieri, F. F., & Bilia, A. R. (2015). A validated HPLC  
565 method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*.  
566 *Food Chemistry*, *175*, 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.129>
- 567 Trevisan, M. T. S., Marques, R. A., Silva, M. G. V., Scherer, D., Haubner, R., Ulrich, C. M., &  
568 Owen, R. W. (2016). Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of  
569 *Lippia* species: Identification, quantitation and antioxidant capacity. *Records of Natural*  
570 *Products*, *10*(4), 485–496.
- 571 Vanzolini, K. L., Sprenger, R. F., Leme, G. M., Moraes, V. R. S., Vilela, A. F. L., Cardoso, C.  
572 L., & Cass, Q. B. (2018). Acetylcholinesterase affinity-based screening assay on *Lippia*  
573 *gracilis* Schauer extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *153*, 232–  
574 237. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.035>

575 **Table 1.** Total content of phenols and flavonoids, IC<sub>50</sub> obtained by the ethanolic extracts of *L. alba*, *L. sidoides* and *L. gracilis* and by the positive  
576 controls for different activities tested.

Samples	IC <sub>50</sub> (µg/mL)								
	Total phenolics (mg GA/g Ext.)	Total flavonoids (mg QE/g Ext.)	DPPH	ABTS	Deoxyribose protection	Fe <sup>3+</sup> reduction	Fe <sup>2+</sup> chelation	Co-oxidation	AChE inhibition
<b>LaEE</b>	30.11±1.24 <sup>a</sup>	6.99±0.28 <sup>a</sup>	47.3±0.00 <sup>a</sup>	4438.0±20.0 <sup>a</sup>	35.73±5.89 <sup>a</sup>	41.62±1.15 <sup>a</sup>	1.29±0.33 <sup>a</sup>	50.81±2.33 <sup>a</sup>	29.34±0.13 <sup>a</sup>
<b>LsEE</b>	9.17±0.26 <sup>b</sup>	8.55±0.10 <sup>b</sup>	69.11±9.26 <sup>a</sup>	441.1±8.16 <sup>b</sup>	127.72±57.11 <sup>b</sup>	32.27±66.2 <sup>a</sup>	5.2±1.9 <sup>a</sup>	6.65±6.72 <sup>c</sup>	35.32±0.10 <sup>a</sup>
<b>LgEE</b>	9.87±0.71 <sup>b</sup>	8.76±0.27 <sup>b</sup>	37.45±0.98 <sup>a</sup>	625.6±31.3 <sup>c</sup>	11.32±0.0 <sup>c</sup>	61.48±14.54 <sup>a</sup>	0.59±0.08 <sup>a</sup>	29.96±4.17 <sup>a</sup>	25.82±0.19 <sup>a</sup>
<b>Ascorbic Acid</b>	-	-	7.57±1.13 <sup>b</sup>	195.4±4.52 <sup>d</sup>	33.29±0.98 <sup>a</sup>	27.52±0.79 <sup>b</sup>	9.79±1.12 <sup>b</sup>	709.27±127.43 <sup>d</sup>	-
<b>Physostigmine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	1.15±0.05 <sup>b</sup>

577 These results are expressed as mean ± SD (n=3). Means followed by different letters differ by Tukey's test with P < 0.05. LaEE: *Lippia alba*

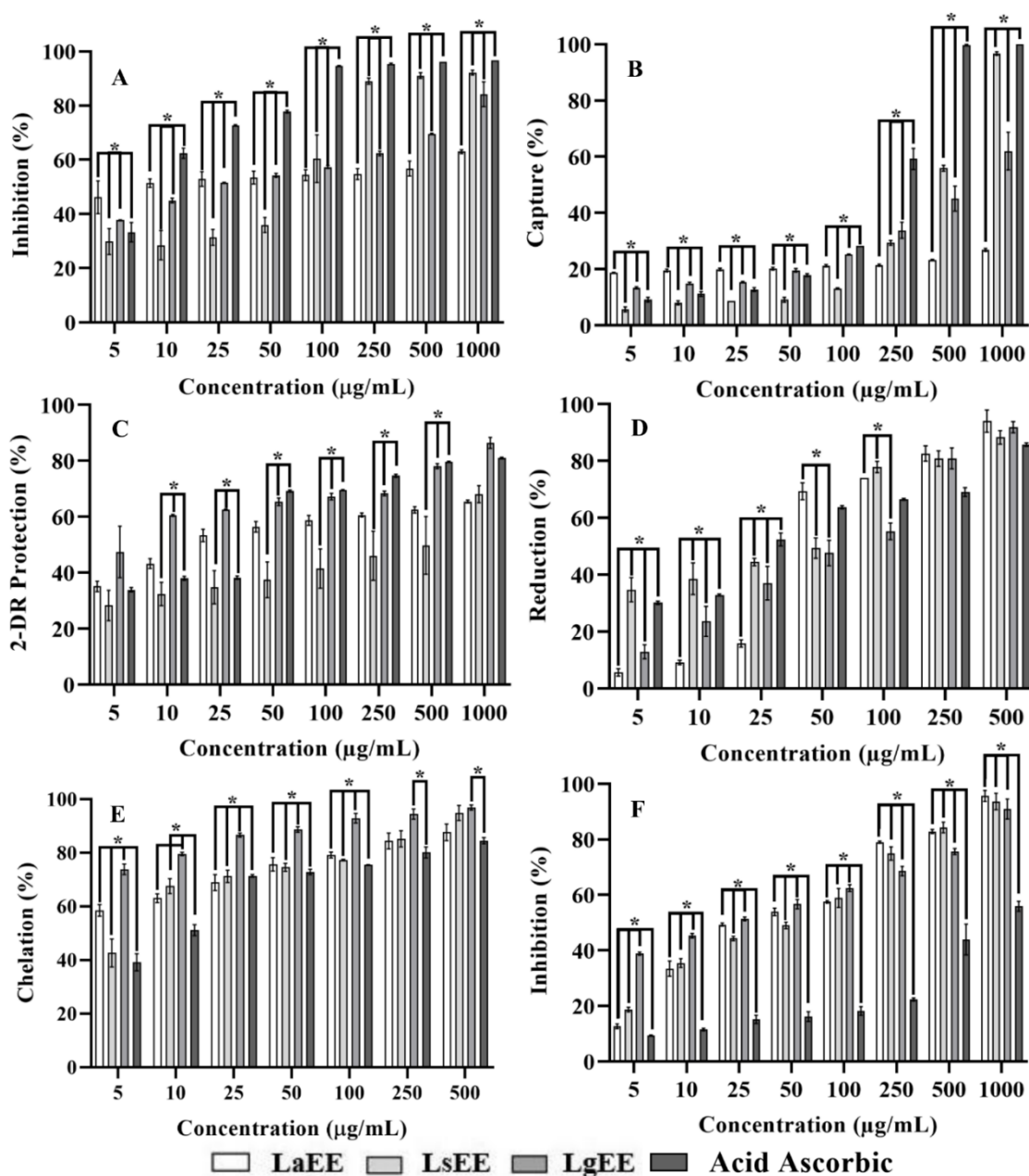
578 ethanolic extract; LsEE: *Lippia sidoides* ethanolic extract; LgEE: *Lippia gracilis* ethanolic extract.



579

580 **Figure 1.** Main compounds identified in the ethanolic extracts of *L. alba*, *L. sidoides* and *L.*  
 581 *gracilis*. Compounds: 1. Acteoside; 2. Apigenin; 3. Apigenin-7-O-glucuronide; 4. Chrysoeriol;  
 582 5. Cirsimaritin; 6. Emodin-8-O-glicoside; 7. Eriodictyol; 8. Geniposidic acid; 9. Iso-orientin;  
 583 10. Isorhamnetin; 11. Loganic acid; 12. Loganin; 13. Luteolin; 14. Luteolin-6-O-glicoside; 15.  
 584 Monotropein; 16. Naringenin; 17. Orientin; 18. Quercetin; 19. Shanzhiside methyl ester; 20.  
 585 Taxifolin; 21. Tricin-7-O-glucuronide; 22. Tuberonic acid glucoside.

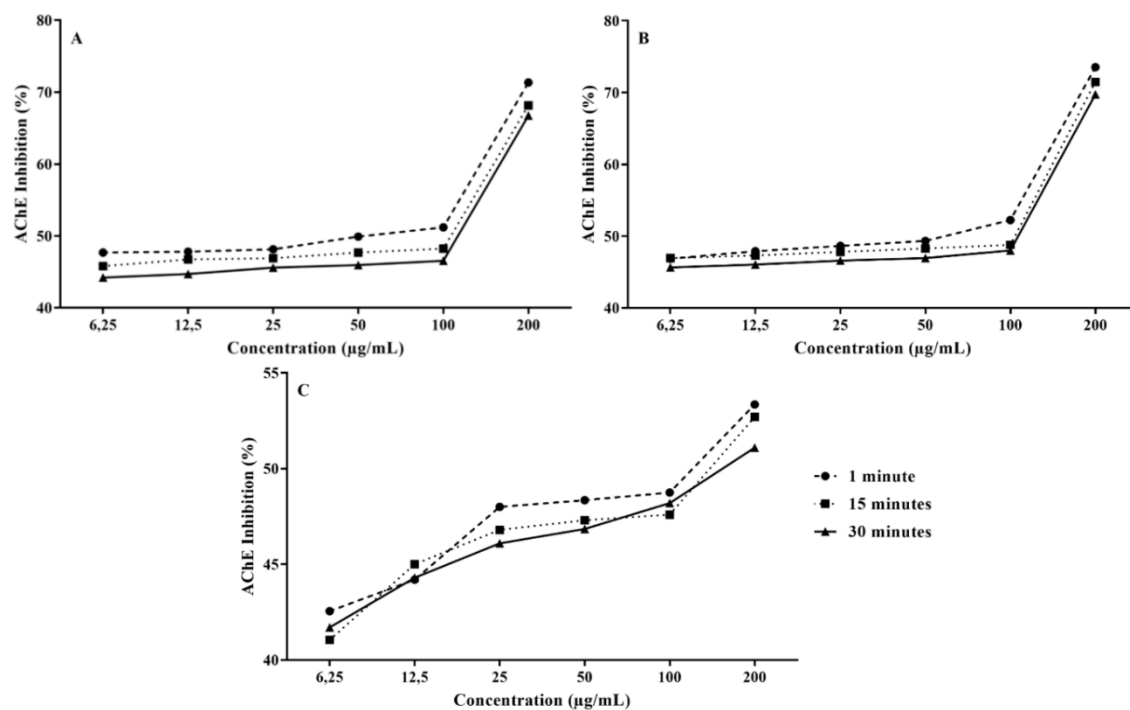
586



587

588 **Figure 2.** Antioxidant activity of the ethanolic extracts of *L. alba* (LaEE), *L. sidoides* (LsEE)  
 589 and *L. gracilis* (LgEE) by different mechanisms. A: DPPH free radical scavenging; B: ABTS  
 590 radical sequestration; C: Deoxyribose protection; D: Fe<sup>3+</sup> reduction; E: Fe<sup>2+</sup> chelation; F:  
 591 Inhibition of linoleic acid degradation. Ascorbic acid was used as a standard antioxidant control.  
 592 \*: P < 0.05. Data were analyzed by ANOVA and Tukey's post hoc test.

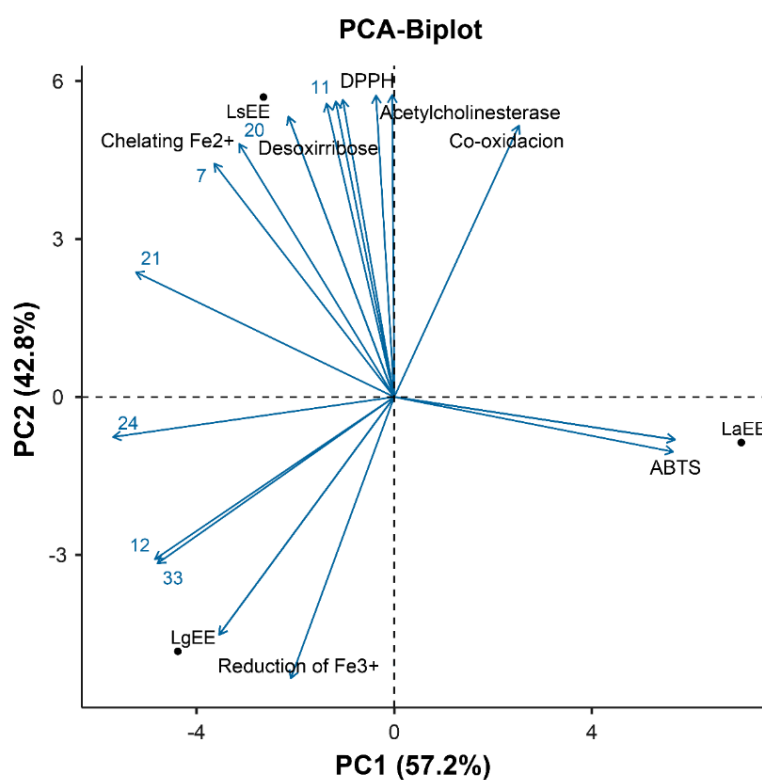
593



594

595 **Figure 3.** Inhibition of AChE promoted by ethanolic extracts of *L. alba* (A), *L. sidoides* (B) and  
 596 *L. gracilis* (C) at different times.

597

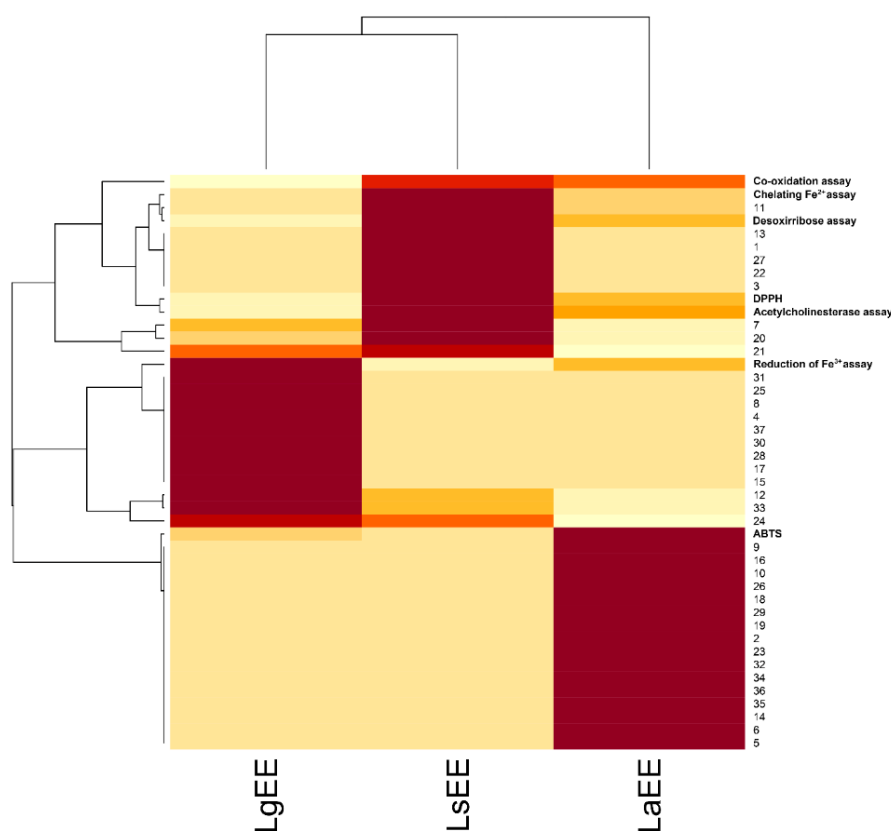


598

599 **Figure 4.** The biplot of PCA describing data sets obtained from the chemical compositions,  
 600 antiradical assay (DPPH, ABTS, Desoxirribose, Reduction of Fe<sup>3+</sup>, Chelating Fe<sup>2+</sup> and  
 601 Cooxidation) and biological activity (Acetylcholinesterase inhibition) of Lippia extracts. LaEE:

602 Lippia alba ethanolic extract; LsEE: Lippia sidoides ethanolic extract; LgEE: Lippia gracilis  
 603 ethanolic extract; Compounds: 1. 3-Hydroxyphlorizin; 2. Acteoside; 3. Apigenin; 4. Apigenin-  
 604 6,8-C-diglucoside; 5. Apigenin-7-O-glucuronide; 6. Chrysoeriol; 7. Cirsimaritin; 8.  
 605 Dihydrokaempferol; 9. Dihydroxy-tetramethoxy flavone; 10. Dihydroxy-trimethoxyflavone;  
 606 11. Emodin-8-O-glicoside; 12. Eriodictyol; 13. Eriodictyol-7-O-glicoside; 14. Geniposidic  
 607 acid; 15. Isoorientin; 16. Isorhamnetin; 17. Isovitexin; 18. Loganic acid; 19. Loganin; 20.  
 608 Luteolin; 21. Luteolin-6-O-glicoside; 22. Luteolin-7-O-rutinose; 23. Monotropein; 24.  
 609 Naringenin; 25. Orientin; 26. Oxo-dihydroxy-octadecenoic acid; 27. Phloridzin; 28.  
 610 Pinocembrin; 29. Quercetagenin-dimethyl-O-hexoside; 30. Quercetin; 31. Sakuranetin; 32.  
 611 Shanzhiside methyl ester; 33. Taxifolin; 34. Tricin; 35. Tricin 7-O-glucuronide; 36. Tuberonic  
 612 acid glucoside; 37. Vitexin.

613



614

615 **Figure 5.** Heatmap of variables based on chemical composition and biological properties  
 616 present in ethanolic extract of *Lippia* species. LaEE: *Lippia alba* ethanolic extract; LsEE: *Lippia*  
 617 *sidoides* ethanolic extract; LgEE: *Lippia gracilis* ethanolic extract.

618

### CAPÍTULO 3

**Artigo 3:** Atividade antibacteriana, toxicidade e efeito ansiolítico via neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica de espécies do gênero *Lippia* L. em Zebrafish adultos.

**Autores:** Carla de Fatima Alves Nonato, Emerson Vinicius Silva de Melo, Cicera Janaine Camilo, Maria Kueirislene Amâncio Ferreira, Jane Eire Alencar de Meneses, Antonio Wlisses da Silva, Hélcio da Silva Santos, José Galberto Martins da Costa.

**Periódico:** Foods.

**Link:** -

**Qualis:** A2 (Percentil 75,87).

**Fator de impacto (JCR):** 5,561.

**Situação:** Submetido.

**Resumo:** As espécies do gênero *Lippia* são mundialmente utilizadas como alimentos, bebidas e temperos, sendo relatadas suas atividades antioxidante, sedativa, analgésico, anti-inflamatória e antipirética. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana, toxicidade e o efeito ansiolítico via neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica de três espécies deste gênero. A atividade antibacteriana foi avaliada pela concentração inibitória mínima e modulação de antibióticos. A toxicidade e efeito ansiolítico foram avaliados pelo modelo *zebrafish*. Todos os extratos e óleos essenciais apresentaram potencial antibacteriano, especialmente os de *L. sidoides*, bem como atividade modulatória, com destaque para o extrato de *L. alba* com melhores efeitos sinérgicos. As amostras não foram tóxicas em 96 h de exposição e apresentaram efeito ansiolítico, neuromodulando o receptor GABA<sub>A</sub>. O extrato de *L. alba* neuromodulou o receptor 5-HT. Essas novas evidências farmacológicas abrem horizontes para abordagens terapêuticas a serem investigadas buscando relacionar as atividades apresentadas com a composição e seu potencial nas terapias ansiolítica e antibacteriana, assim como na conservação de alimentos.

**Palavras-chave:** Verbenaceae; MIC; Modulação; Toxicidade; Ansiolítico; receptores de Serotonina.

**Atividade antibacteriana, toxicidade e efeito ansiolítico via neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica de espécies do gênero *Lippia* L. em Zebrafish adultos**

Carla de Fatima Alves Nonato<sup>1,2</sup>, Emerson Vinicius Silva de Melo<sup>2</sup>, Cicera Janaine Camilo<sup>2</sup>, Maria Kueirislene Amâncio Ferreira<sup>3</sup>, Jane Eire Alencar de Meneses<sup>3</sup>, Antonio Wlisses da Silva<sup>4</sup>, Hécio da Silva Santos<sup>1,3,4</sup>; José Galberto Martins da Costa<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato-CE, 63105-000, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato-CE, 63105-000, Brasil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, 60714-903, Brasil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, 60714-903, Brasil.

\*Autor correspondente: [galberto.martins@gmail.com](mailto:galberto.martins@gmail.com).

**Resumo:** As espécies do gênero *Lippia* são mundialmente utilizadas como alimentos, bebidas e temperos, sendo relatadas suas atividades antioxidante, sedativa, analgésico, anti-inflamatória e antipirética. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana, toxicidade e o efeito ansiolítico via neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica de três espécies deste gênero. A atividade antibacteriana foi avaliada pela concentração inibitória mínima e modulação de antibióticos. A toxicidade e efeito ansiolítico foram avaliados pelo modelo *zebrafish*. Todos os extratos e óleos essenciais apresentaram potencial antibacteriano, especialmente os de *L. sidoides*, bem como atividade modulatória, com destaque para o extrato de *L. alba* com melhores efeitos sinérgicos. As amostras não foram tóxicas em 96 h de exposição e apresentaram efeito ansiolítico, neuromodulando o receptor GABA<sub>A</sub>. O extrato de *L. alba* neuromodulou o receptor 5-HT. Essas novas evidências farmacológicas abrem horizontes para abordagens terapêuticas a serem investigadas buscando relacionar as atividades apresentadas com a composição e seu potencial nas terapias ansiolítica e antibacteriana, assim como na conservação de alimentos.

**Palavras-chave:** Verbenaceae; MIC; Modulação; Toxicidade; Ansiolítico; receptores de Serotonina.



## 1. Introdução

Os transtornos de ansiedade estão entre as dez principais doenças responsáveis por incapacidades no mundo, tendo o Brasil sido considerado, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o país com maior índice de transtornos de ansiedade das Américas em 2015, atingindo 9,3% da população [1]. Os benzodiazepínicos (BZD) são os medicamentos utilizados contra ansiedade a décadas e atuam como moduladores alostéricos positivos em receptores GABA<sub>A</sub>, exibindo também propriedades amnésicas, anticonvulsivantes, sedativas, relaxantes musculares, onde seu uso crônico provoca tolerância e efeitos colaterais consideráveis [2,3].

Simultaneamente, outro problema da saúde mundial é a resistência antimicrobiana. Diversas bactérias patogênicas desenvolveram resistência às principais classes de antibióticos e bactérias multirresistentes causam infecções intratáveis, levando a alta morbidade e mortalidade em ambientes clínicos devido à falta de identificação precoce de microrganismos causadores e seus padrões de suscetibilidade antimicrobiana como também ao uso aberto e desnecessário de antibióticos de amplo espectro [4,5].

A falta de terapias eficientes, de medidas de prevenção bem-sucedidas e a baixa disponibilidade de novos antibióticos exigem o desenvolvimento de diferentes opções de tratamento e terapias antimicrobianas alternativas [6]. Da mesma forma que, devido aos efeitos adversos das drogas usuais, a busca por medicamentos seguros e adequados de fontes naturais que tratem a ansiedade se faz necessário [7].

Plantas medicinais são tradicionalmente utilizadas para a cura de alguns distúrbios, mas também se destaca como matéria-prima para a recuperação de compostos bioativos, promovendo propriedades benéficas à saúde [8]. Estudos mostram que diferentes extratos vegetais e produtos naturais vêm sendo estudados por seus potenciais farmacológicos, especialmente os fitoquímicos dietéticos como terpenos, compostos fenólicos, dentre outros [7].

As espécies do gênero *Lippia* são mundialmente utilizadas como alimentos, bebidas, temperos e no tratamento de doenças dos tratos gastrointestinal e respiratório, também agindo como analgésico, anti-inflamatório e antipirético [9]. Estudos mostram ação no sistema nervoso central, atuando como analgésico, ansiolítico, anticonvulsivo, sedativo, antinocepsivo, bem como suas ações antioxidante, antiulcerogênica, antisséptica, antimicrobiana, dentre outras [10].

Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivo verificar a toxicidade e os potenciais antibacteriano e o ansiolítico via neurotransmissão GABAérgica de três espécies do gênero *Lippia* encontradas no Cariri cearense.

## 2. Metodologia

### 2.1. Material vegetal e obtenção dos extratos

As informações sobre coleta do material vegetal e obtenção dos óleos essenciais foram descritos em Nonato et al. [11], onde as folhas de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson e *Lippia sidoides* Cham. foram coletadas no Horto de plantas medicinais da Universidade Regional do Cariri (7°14'20.1"S 39°24'53.1"W) em janeiro de 2019 e as excisatas de cada espécie foram depositadas no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima (HDCAL/URCA) sob números de identificações 13907 e 3038, respectivamente. As folhas de *Lippia gracilis* Schauer foram coletadas no bairro Gisélia Pinheiro, município de Crato, Ceará, Brasil (7°13'05.2"S 39°25'44.9"W) em maio de 2019, com excisata depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, com registro nº 44456.

A extração dos óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. Amostras de folhas frescas foram trituradas e submetidas à destilação por 2 h. Após a extração, os óleos essenciais de *L. alba* (LaEO), *L. sidoides* (LsEO) e *L. gracilis* (LgEO) foram secos com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [11]. Simultaneamente, as folhas frescas foram submetidas a maceração exaustiva em etanol (99% por 72 h). As soluções obtidas foram concentradas em rota evaporador a 50 °C sob pressão reduzida, obtendo-se os extratos etanólicos de *L. alba* (LaEE), *L. sidoides* (LsEE) e *L. gracilis* (LgEE).

### 2.2. Drogas e reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias: gentamicina, amicacina, benzilpenicilina e cefalotina (Sigma Chemical Corp.); diazepam (DZP; Neo Química®), flumazenil (Fmz; Sandoz®), dimetilsulfóxido (DMSO; Dynamic®), cloridrato de Granisetron (Gstn; Corepharma/Middlesex, NJ, EUA), maleato de pizotifeno (Piz; Farmácia Central de Manipulação/São Paulo, SP, Brasil), fluoxetina (Flx; Eli Lilly/Indianapolis, IN, EUA) e Ciproheptadina (Cypro; Evidence Soluções Farmacêuticas/Fortaleza, CE, Brasil).

### 2.3. Atividade antibacteriana

#### 2.3.1. Concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana foi testada pelo método de microdiluição com base no documento M100 [12]. O ensaio foi realizado com quatro linhagens bacterianas: *Staphylococcus aureus* Sa 358, *Streptococcus mutans* INCQS 00446, *Escherichia coli* Ec 27 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

As amostras foram diluídas em água destilada estéril e DMSO (1024 µg/mL). Seguiram-se diluições seriadas através da adição aos poços contendo a suspensão (10<sup>5</sup> UFC/mL, BHI 10%), atingindo concentrações no intervalo de 512 a 8 µg/mL. Todo o teste foi realizado em triplicata e a placa incubada a 35±2 °C por 24 h. A leitura foi realizada por colorimetria, adicionando 25 µL de solução de resazurina (0,01%) a cada poço após a incubação. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento dos microrganismos.

### 2.3.2. Avaliação da modulação por contato direto

Para analisar a ação dos óleos essenciais e extratos etanólicos como potencializadores de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) e dos beta-lactâmicos (benzilpenicilina e cefalotina), seguiu-se a metodologia proposta por Coutinho et al. [13]. Foram usadas as linhagens bacterianas multirresistentes *Staphylococcus aureus* Sa 358 e *Escherichia coli* Ec 27 (Tabela 1). O teste foi realizado na presença e ausência das amostras em estudo.

Os inóculos (CIM/8) em BHI a 10% foram distribuídos em placas de microdiluição seguidos da adição de concentrações das soluções de antibióticos (1024 µg/mL) através de diluição seriada. As placas foram incubadas a 35±2 °C por 24 h e a leitura realizada por colorimetria pela adição de 25 µL de solução de resazurina (0,01%).

**Tabela 1.** Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos.

Bactéria	Origem	Perfil de resistência
<i>Staphylococcus aureus</i> Sa 358	Ferida Cirúrgica	Ami, But, Ca, Gen, Neo, Net, Oxa, Para, Sis, Tob.
<i>Escherichia coli</i> Ec 27	Ferida Cirúrgica	Ami, Amox, Amp, Ast, Ax, Ca, Can, Caz, Cf, Cfc, Cip, Clo, Im, Szt, Tet, Tob.

Ami: Amicacina; Amox: Amoxicilina; Amp: Ampicilina; Ast: Azitromicina; Ax: Amoxicilina; But: Butirosina; Ca: Cefalexina; Can: Canamicina; Caz: Ceftazimidina; Cf: Cefalotina; Cfc: Cefaclor; Cip: Ciprofloxacino; Clo: Clorafenicol; Gen: Gentamicina; Im: Imipenem; Neo: Neomicina; Net: Netilmicina; Oxa: Oxacilina; Para: Paramomicina; Sis: Sisomicina; Szt: Sulfametoxazol; Tet: Tetraciclina; Tob: Tobramicina. Tabela adaptada de Sobral et al. [14].

## 2.4. Bioensaios com Zebrafish

### 2.4.1. Animais

Animais zebrafish adulto (*Danio rerio*) com 60 a 90 dias ( $0,4\pm 0,1$  g), selvagens, de ambos os sexos, foram obtidos de um fornecedor comercial (Fortaleza, CE). Os animais foram mantidos em aquário de vidro ( $n=5/L$ ), à temperatura de  $25\pm 2$  °C, em ciclos de claro-escuro por 24 h. Água foi tratada com anticloro. Os bioensaios realizados estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (04983945/2021). Após os experimentos, os animais foram sacrificados por congelamento, imersos em água gelada ( $2-4$  °C), por 10 min até perda de movimentos operculares.

#### 2.4.2. Toxicidade aguda 96 h

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish adulto de acordo com a Organização de Cooperação Econômica e Método Padrão de Desenvolvimento [15] para determinar a  $DL_{50-96h}$ . A mortalidade foi controlada de 12 em 12 h após o início dos testes. Os animais ( $n=6$ /grupo) foram tratados, via intraperitoneal (*i.p.*), com 20  $\mu$ L dos óleos essenciais (4; 20 e 40 mg/kg; 20  $\mu$ L; *i.p.*) e dos extratos (40; 200 e 400 mg/kg; 20  $\mu$ L; *i.p.*), veículo (DMSO 3%). Após 96 h, foram contabilizados o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a dose letal capaz de matar 50 % dos animais ( $DL_{50}$ ) através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% [16].

#### 2.4.3. Avaliação da atividade locomotora (teste de campo aberto)

Os animais receberam aplicação da amostra e posteriormente foram submetidos ao teste de campo aberto [17] para avaliar se houve alteração no sistema motor, seja por sedação e/ou relaxamento muscular. Os animais ( $n=6$ /grupo) foram tratados, via intraperitoneal, com os óleos essenciais (4; 20 e 40 mg/kg; 20  $\mu$ L; *i.p.*) e os extratos (40; 200 e 400 mg/kg; 20  $\mu$ L; *i.p.*), grupo com veículo (DMSO 3%) e grupo tratado com DZP (4 e 10 mg/kg; 20  $\mu$ L; *i.p.*). Após 30 min dos tratamentos, os animais foram adicionados em placas de Petri (10 x 15 cm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL).

#### 2.4.4. Avaliação Ansiolítica (Teste claro-escuro)

O comportamento de ansiedade de um animal pode ser observado através do teste claro/escuro. Semelhante aos roedores, o zebrafish evita naturalmente as áreas iluminadas [18] O experimento foi realizado em um aquário de vidro (30 cm x 15 cm x 20 cm) dividido em uma área clara e uma área escura. O aquário foi cheio até 3 cm com água da torneira sem cloro e metais pesados, o que simulou um novo ambiente raso diferente do aquário convencional e

capaz de induzir comportamentos de ansiedade. Nos animais (n=6/grupo), 20 µL dos óleos essenciais (4; 20 e 40 mg/kg; 20 µL; *i.p.*) e dos extratos (40; 200 e 400mg/kg; 20 µL; *i.p.*). Os grupos de controle negativo e positivo consistiram em DMSO (3%) e solução de DZP (4 e 10 mg/kg), respectivamente. Após 1 h de tratamento, os animais foram colocados individualmente na zona clara e o efeito ansiolítico foi medido com base no tempo gasto na zona clara do aquário dentro de 5 minutos de observação [19].

#### 2.4.5. Avaliação da neuromodulação GABAérgica

Os mecanismos de ação das amostras que possuíram efeito ansiolítico foram identificados através do pré-tratamento com Fmz (antagonista dos BZD no receptor GABA<sub>A</sub>) [20]. Zebrafish (n = 6/grupo) foram pré-tratados com Fmz (4 mg/kg; 20 µL; *i.p.*). Após 15 min, foi administrada a melhor dose efetiva das amostras com efeito ansiolítico (4 mg/kg; 20 µL; *i.p.* para LaOE e LsOE; 40 mg/kg; 20 µL; *i.p.* para LgOE; 400 mg/kg; 20 µL; *i.p.* para os extratos) encontrada no teste piloto (ver seção anterior). Um grupo tratado com DMSO a 3 % (veículo; 20 µL; *i.p.*) foi usado como controle negativo. O DZP (4 mg/kg, 20 µL; *i.p.*) foi usado como agonista do canal de ligação dos BZD no GABA<sub>A</sub>. Após 30 min do tratamento, os animais foram submetidos ao teste claro/escuro conforme descrito na seção anterior.

#### 2.4.6. Avaliação da neuromodulação serotoninérgica

Os receptores envolvidos no efeito ansiolítico de LaEE foram identificados pelo pré-tratamento com ciproheptadina (antagonista de 5-HT<sub>R2A</sub>), pizotifeno (antagonista de 5-HT<sub>R1</sub> e 5-HT<sub>R2A/2C</sub>) e granisetron (antagonista de 5-HT<sub>R3A/3B</sub>) antes da LDT [20]. Zebrafish (n=6/grupo) foram pré-tratados por via oral (*v.o.*) ciproheptadina (32 mg/kg; 20 µL; *v.o.*), pizotifeno (32 mg/kg; 20 µL; *v.o.*), ou granisetron (20 mg/kg; 20 µL; *v.o.*). Após 15 min, a melhor dose ansiolítica de LaEE (400 mg/kg; 20 µL) encontrada no piloto (ver seção anterior) foram administradas via intraperitoneal. DMSO a 3% (Veículo; 20 µL; *i.p.*) foi usado como um controle negativo e fluoxetina (Flx; 0,05 mg/kg; *i.p.*) foi usada como agonista do 5-HT. Após 1 h dos tratamentos, os animais foram submetidos ao teste claro/escuro descrito na seção anterior.

### 2.5. Análise Estatística

Para a atividade antibacteriana, os dados obtidos para cada amostra e concentração foram verificados quanto à distribuição normal e, em seguida, analisados por ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. Enquanto, para os testes com *Zebrafish*, os resultados foram expressos como valores da média ± erro padrão da média para cada grupo de 6 animais. Depois

de confirmar a normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à ANOVA unidirecional e two-way ANOVA para o mecanismo de ação via GABA, seguido do teste de Tukey. O software GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA) foi utilizado em todas as análises e os resultados com  $P < 0.05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Atividade antibacteriana

As cepas testadas mostraram-se sensíveis a todas as amostras testadas (Tabela 2). O LsEO demonstrou maior efetividade na inibição das cepas bacterianas, apresentando menor valor de CIM de 53,3  $\mu\text{g/mL}$  frente a *S. aureus* 358. Além disso o LsEO mostrou-se mais efetivo que as demais amostras, obtendo menores valores de CIM frente a todas as bactérias testadas, exceto frente a *E. coli* 27, que foi mais sensível ao extrato da mesma espécie. A cepa *E. coli* 27 apresentou sensibilidade a todas as amostras testadas, apresentando menores valores de CIM quando comparada as demais linhagens estudadas. A ação do LsEO pode estar relacionada aos seus constituintes, como timol e eucaliptol, que são reconhecidos por sua atividade antimicrobiana [11,21,22].

**Tabela 2.** Concentrações inibitórias mínimas dos óleos essenciais e extratos etanólicos de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis*.

Bactérias	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	LaEO	LsEO	LgEO	LaEE	LsEE	LgEE
<i>Staphylococcus aureus</i> Sa 358	256	53,3	512	853,3	128	512
<i>Streptococcus mutans</i> INCQS 00446	213,3	106,6	512	$\geq 1024$	170,6	853,3
<i>Escherichia coli</i> Ec 27	106,6	106,6	426,6	768	74,6	256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	213,3	128	512	$\geq 1024$	298,6	682,6

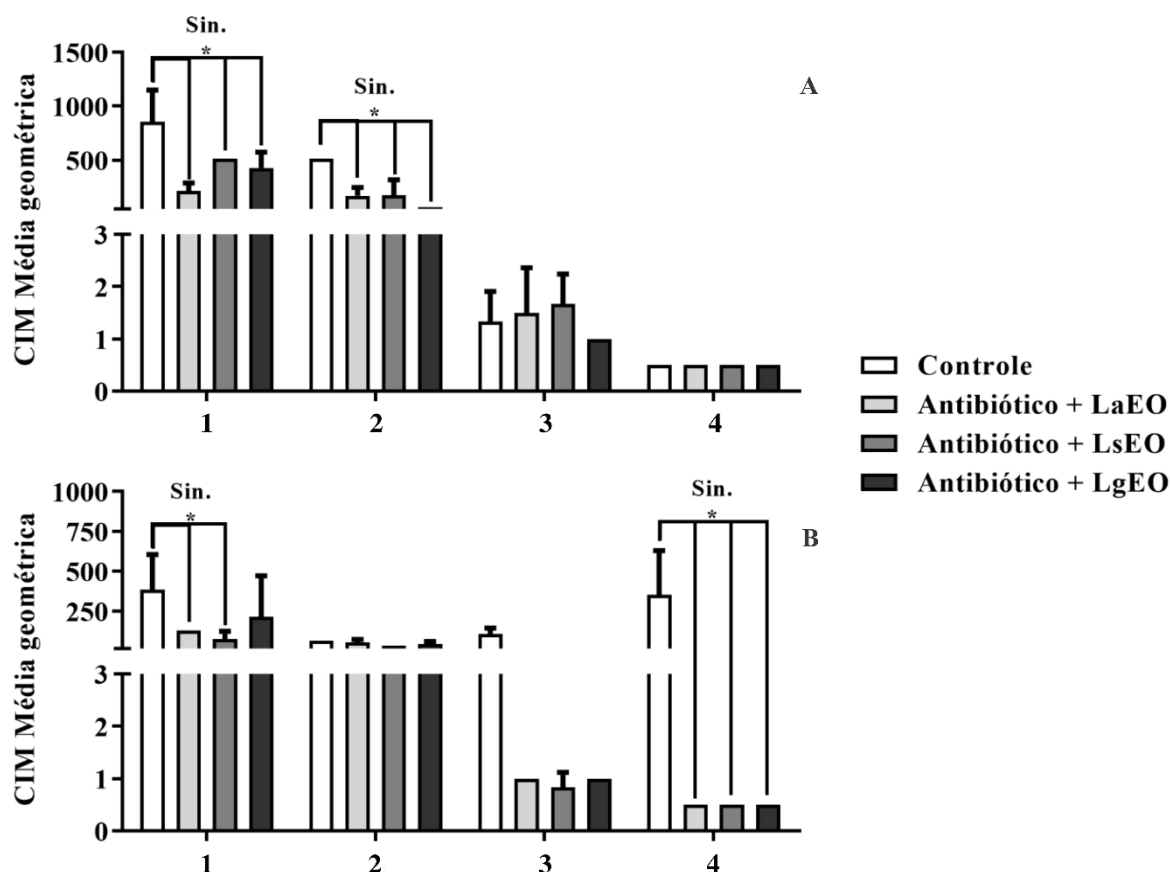
INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; ATCC: American Type Culture Collection. LaEO: óleo essencial de *Lippia alba*; LsEO: óleo essencial de *Lippia sidoides*; LgEO: óleo essencial de *Lippia gracilis*; LaEE: extrato etanólico de *Lippia alba*; LsEE: extrato etanólico de *Lippia sidoides*; LgEE: Extrato etanólico de *Lippia gracilis*.

A análise da atividade moduladora de antibióticos dos óleos essenciais e extratos etanólicos de *Lippia* contra cepas bacterianas mostrou efeitos sinérgicos e antagônicos, como pode ser observado nas Figuras 1 e 2. Frente a *S. aureus*, o LaEO combinado com a amicacina,

apresentou efeito sinérgico mais expressivo para os óleos essenciais, diminuindo a concentração de 853,3 µg/mL para 213,3 µg/mL. Efeito semelhante foi obtido para LsEO e LgEO com este antibiótico, obtendo concentrações reduzidas de 512 µg/mL e 426,6 µg/mL. Associados com a gentamicina, LaEO e LsEO obtiveram taxa de redução semelhante, variando de 512 µg/mL para 170,6 µg/mL e 173,3 µg/mL, respectivamente. Já LgEO mostrou maior eficácia reduzindo a CIM da gentamicina para 64 µg/mL.

O óleo essencial de *L. alba* potencializou o efeito da eritromicina com aumento de 221,4% do diâmetro da zona de inibição em *S. aureus* ATCC 25923 numa concentração de apenas 12% [23]. Já o óleo essencial de *L. sidoides* frente a *S. aureus* ATCC 12624 reduziu em 4 vezes os valores das CIMs da gentamicina e neomicina [24]. Além disso, estudos mostram a ação dos óleos essenciais destas espécies contra patógenos de origem alimentar, primordial para aplicações como conservante na indústria alimentícia [25].

Quanto aos beta-lactâmicos (Figura 1A), nenhum dos óleos exerceram efeito estatisticamente significativo combinados com estes antibióticos. Juntos com a benzilpenicilina houve apenas um único sinergismo, com redução baixa para LgEO de 1,3 µg/mL para 1 µg/mL. Os demais óleos apresentaram efeito antagônico combinados, aumentando o valor da CIM para 1,5 µg/mL com LaEO e 1,6 µg/mL com LgEO. Agregados a Cefalotina, não houve nenhum efeito. Veras et al. (2017), ao testar o óleo essencial de *L. sidoides* frente a diferentes bactérias Gram-positivas e negativas, demonstrou não haver efeito modulador associado a benzilpenicilina e ceftriaxona.



**Figura 1.** Efeito modulador dos óleos essenciais de *L. alba* (LaEO), *L. sidoides* (LsEO) e *L. gracilis* (LgEO) sobre a atividade antibiótica de amicacina (1), gentamicina (2), benzilpenicilina (3) e cefalotina (4) contra cepas de *Staphylococcus aureus* Sa 358 (A) e *Escherichia coli* Ec 27 (B). Sin.: Sinergismo; Ant.: Antagonismo; \*: p <0,05 (ANOVA e teste de Bonferroni).

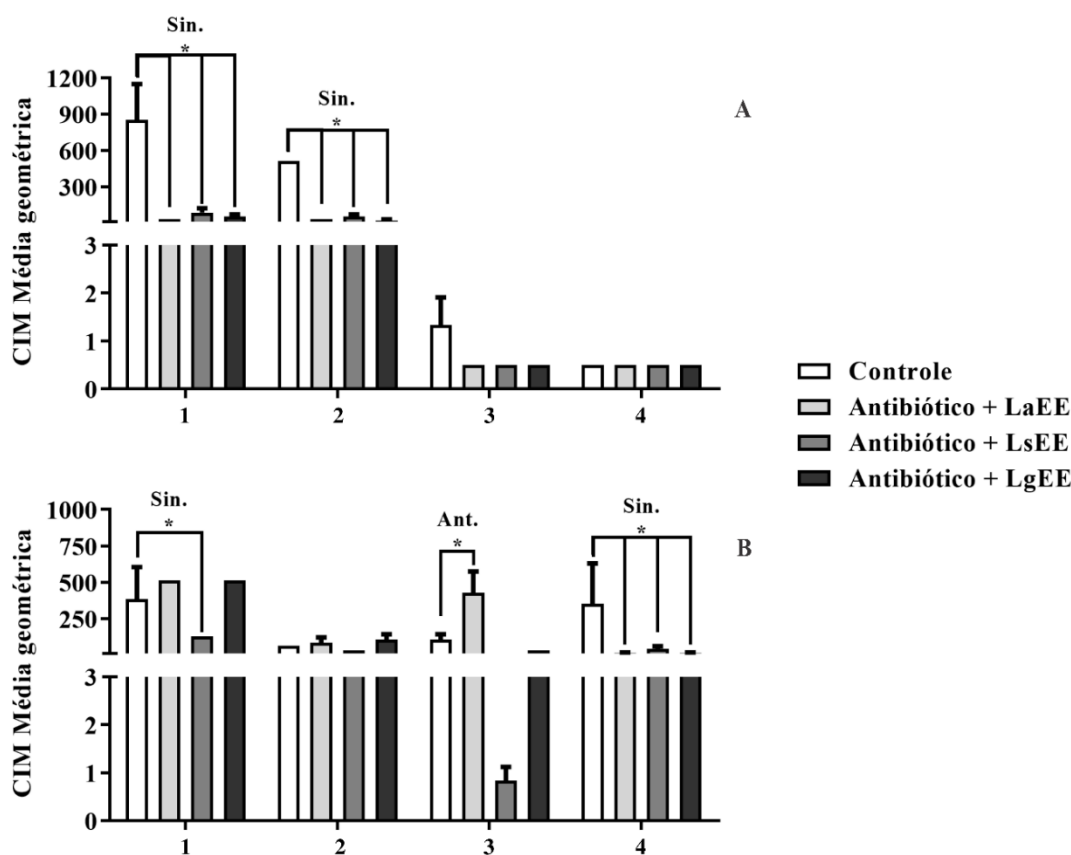
Frente a *E. coli* (Figura 1B), os óleos apresentaram somente efeitos sinérgicos combinados com todos os antibióticos testados. Com a amicacina, LaEO e LsEO foram capazes de diminuir o valor da CIM de 384  $\mu\text{g/mL}$  para 128  $\mu\text{g/mL}$  e 74,6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Já combinados com a cefalotina, os três óleos tiveram o mesmo índice de redução, de 352  $\mu\text{g/mL}$  para 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Para a benzilpenicilina, houve queda no valor da CIM de 106,6  $\mu\text{g/mL}$  para 1  $\mu\text{g/mL}$  por LaEO e LgEO e 0,83  $\mu\text{g/mL}$  por LsEO, mas não foram estatisticamente significativos. Este efeito pode estar ligado ao caráter lipofílico dos óleos essenciais que interage com os lipopolissacarídeos da membrana externa da parede celular das bactérias Gram-negativas, promovendo a partição da membrana externa e alterando a estrutura e função, o que desencadeia a lise bacteriana [26].

Os extratos etanólicos das três espécies testadas apresentaram efeito sinérgico significativo, combinados com antibióticos da classe dos aminoglicosídeos frente a *S. aureus*



(Figura 2A). O LaEE mostrou melhor redução obtida para os extratos, diminuindo o valor da CIM da amicacina de 853,3  $\mu\text{g/mL}$  para 32  $\mu\text{g/mL}$ . Este efeito foi seguido pelo LgEE e LsEE com concentrações reduzidas de 53,3  $\mu\text{g/mL}$  e 85,3  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Já combinados com a gentamicina, estes decresceram o valor da CIM de 512  $\mu\text{g/mL}$  para 21,3  $\mu\text{g/mL}$ , 32  $\mu\text{g/mL}$  e 53,3  $\mu\text{g/mL}$  por LaEE, LsEE e LgEE, nesta mesma ordem.

Este efeito pode estar associado a presença de flavonoides na composição destes extratos, tendo estes compostos diferentes mecanismos antimicrobianos reconhecidos como inibição da síntese de ácidos nucleicos, alteração na função e permeabilidade da membrana citoplasmática, inibição do metabolismo energético, redução da adesão celular e formação de biofilme e inibição da porina na membrana celular, sendo estes efeitos associados principalmente a característica anfipática de suas moléculas bem como a potencialização de sua ação por seus substituintes hidrofóbicos [27].



**Figura 2.** Efeito modulador dos extratos etanólicos de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis* sobre a atividade antibiótica de amicacina (1), gentamicina (2), benzilpenicilina (3) e cefalotina (4) contra *Staphylococcus aureus* Sa 358 (A) e *Escherichia coli* Ec 27 (B). Sin.: Sinergismo; Ant.: Antagonismo; \*:  $p < 0,05$  (ANOVA e teste de Bonferroni).

Frente a *E. coli* (Figura 2B), as associações com os extratos mostraram efeitos variados. Com a amicacina, LsEE apresentou efeito sinérgico significativo reduzindo o valor da CIM de 384 µg/mL para 128 µg/mL, enquanto que LsEE e LgEE foram antagonísticos, aumentando a concentração para 512 µg/mL. Combinado com a benzilpenicilina, LaEE antagonizou seu efeito, ampliando o valor da CIM de 106,6 µg/mL para 426,6 µg/mL. Enquanto isso, associados a cefalotina, os três extratos demonstraram sinergismo, com redução de 352 µg/mL para 13,3 µg/mL por LaEE e LgEE e 42,6 µg/mL por LsEE. Efeitos antagonísticos pela combinação entre diferentes antibióticos ou com produtos naturais são relatados na literatura, podendo ocorrer por ligação de compostos onde o antibiótico se ligaria ou a possível mecanismo de quelação do antibiótico diminuindo a ação do fármaco [28].

### 3.2. Bioensaios com Zebrafish

As doses testadas para todas as amostras não foram tóxicas para zebrafish adulto até 96 h de análise (Tabela 3), pois não houve morte e alteração anatômica aparente nos animais durante este período. Para o teste de campo aberto, LgEO e as menores dose de LaEO não causaram comprometimento motor em zebrafish. Diferente da maior dose de LaEO e LsEO que alteraram a locomoção, resultado similar ao DZP, tendo este último efeito dose dependente. Já para os extratos, LsEE não causou redução na locomoção dos animais nas doses testadas, divergindo do LgEE que alterou esta locomoção, efeito também apresentado pelo DZP.

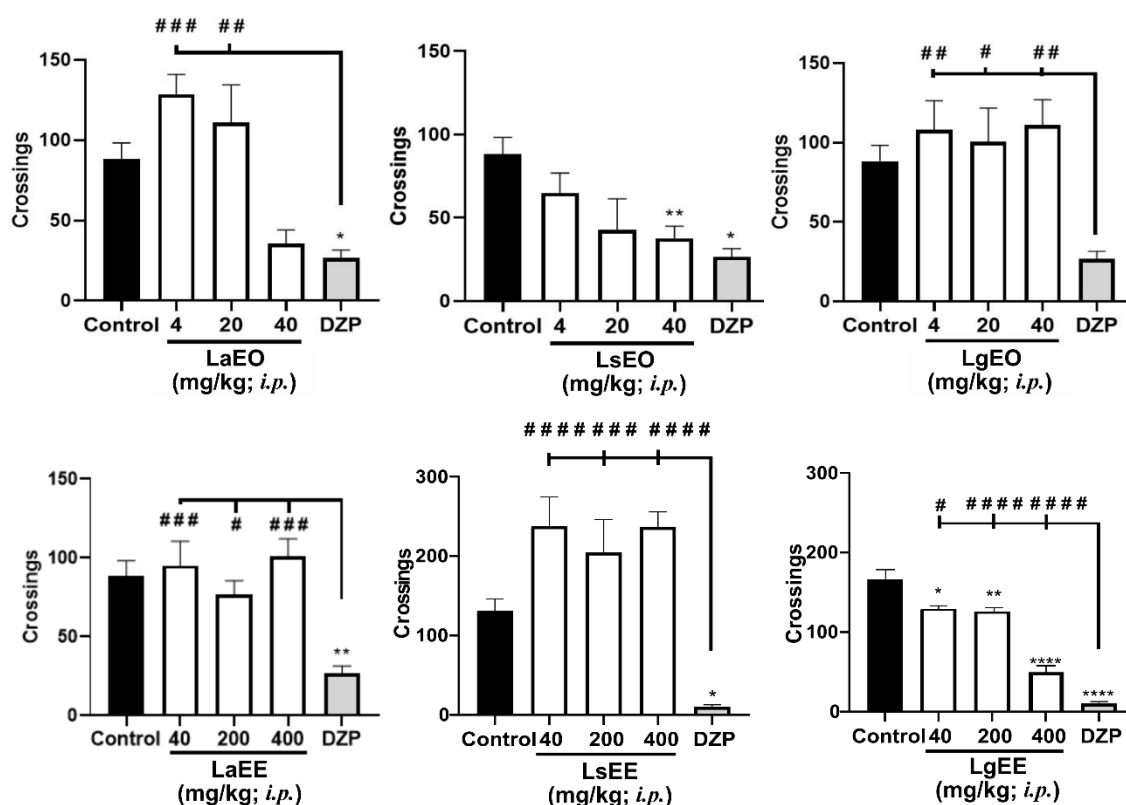
**Tabela 3.** Toxicidade aguda dos óleos essenciais e extratos etanólicos de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis*.

Amostras	Mortalidade				96h
	CN	D1	D2	D3	DL <sub>50</sub> (mg/kg)/IV
<b>LaEO<sup>1</sup></b>	0	0	0	0	> 40
<b>LsEO<sup>1</sup></b>	0	0	0	0	> 40
<b>LgEO<sup>1</sup></b>	0	0	0	0	> 40
<b>LaEE<sup>2</sup></b>	0	0	0	0	> 400
<b>LsEE<sup>2</sup></b>	0	0	0	0	> 400
<b>LgEE<sup>2</sup></b>	0	0	0	0	> 400

CN: Grupo controle negativo (DMSO 3%); D1: Dose 1 (4 mg/kg<sup>1</sup>; 40 mg/kg<sup>2</sup>); D2: Dose 2 (20 mg/kg<sup>1</sup>; 200 mg/kg<sup>2</sup>); D3: Dose 3 (40 mg/kg<sup>1</sup>; 400 mg/kg<sup>2</sup>). DL<sub>50</sub>: Dose letal para matar 50% dos Zebrafish adulto; IV: Intervalo de confiança; LaEO: óleo essencial de *Lippia alba*; LsEO: óleo essencial de *Lippia sidoides*; LgEO: óleo essencial de *Lippia gracilis*; LaEE: extrato

etanólico de *Lippia alba*; LsEE: extrato etanólico de *Lippia sidoides*; LgEE: Extrato etanólico de *Lippia gracilis*.

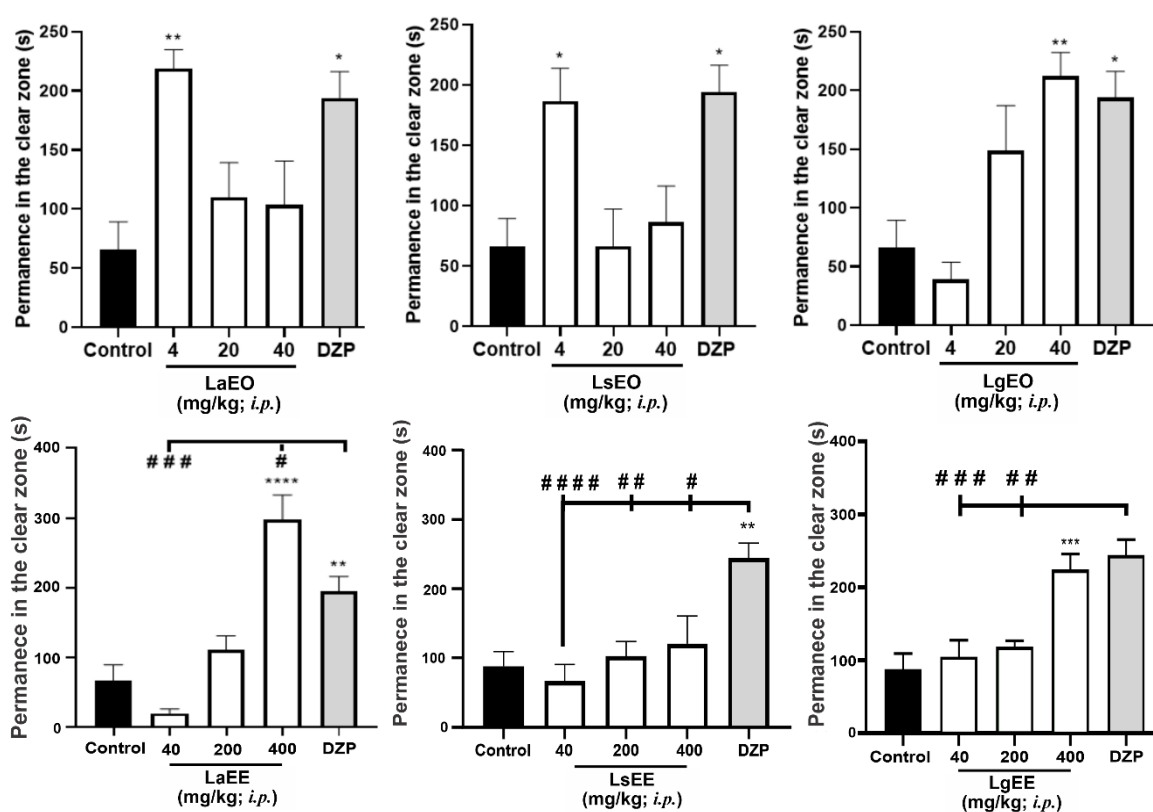
A atividade locomotora é um parâmetro de análise comportamental usado para avaliar produtos químicos que atuam no sistema nervoso central (SNC) em zebrafish [29]. Fármacos ansiolíticos, como os BZD, são relatados como responsáveis por reduzir a locomoção de zebrafish adulto [30]. Nesse estudo foi identificado que não houve alterações na atividade locomotora dos animais nos tratamentos realizados (Figura 3), demonstrando não causar efeitos colaterais como é comum nos BZD. Além disso, não foram observados efeito agudo de toxicidade por parte das amostras analisadas durante as 96 h de análise. Muitas pessoas utilizam plantas medicinais para aliviar distúrbios relacionados ao sistema nervoso central, como depressão, epilepsia, ansiedade e dores, embora a eficácia da maioria delas ainda não tenha sido comprovada por meio de estudos científicos [10].



**Figura 3.** Efeito dos óleos essenciais e extratos etanólicos de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis* sob o comportamento locomotor do zebrafish adulto no Teste de Campo Aberto (0–5 min). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média para 6 animais/grupo; ANOVA seguido pelo teste de Tukey (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , vs. controle; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  vs DZP). LaEO: óleo essencial de *Lippia alba*; LsEO: óleo essencial de *Lippia sidoides*; LgEO:

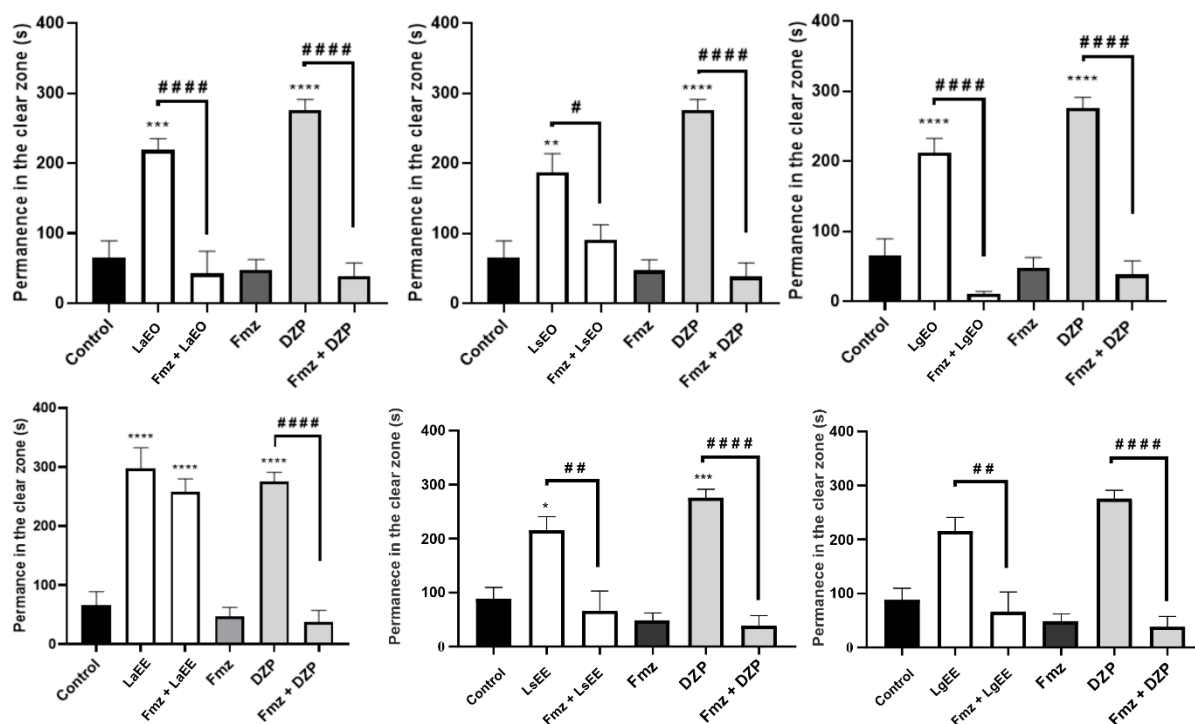
óleo essencial de *Lippia gracilis*; LaEE: extrato etanólico de *Lippia alba*; LsEE: extrato etanólico de *Lippia sidoides*; LgEE: Extrato etanólico de *Lippia gracilis*; DZP: Diazepam.

O paradigma claro-escuro baseia-se na tendência de animais que apresentam ansiedade inata de escapar de compartimento bem iluminado para compartimento escuro, uma resposta antipredatória natural adaptativa induzida. Sendo assim estudos em zebrafish adulto mostraram que os compostos ansiolíticos reduzem a preferência pelo compartimento escuro de forma semelhante ao que ocorre em roedores [31]. Os animais tratados com os LgEO e LaEE (na maior dose), LaEO e LsEO (na menor dose) e LgEE (em todas as doses) apresentaram comportamentos ansiolíticos quando comparados ao grupo controle (Figura 4), pois aumentou a permanência dos animais na área clara do aquário, resultado similar ao efeito do grupo DZP. No entanto, LsEE não reverteu o comportamento de ansiedade nos animais. Vários estudos demonstram efeitos sedativos, ansiolíticos e anticonvulsivantes de *L. alba* [10] e *L. sidoides* [32], estando esta atividade ligada aos seus constituintes, como citral,  $\beta$ -mirceno, limoneno, timol, carvacrol, dentre outros [33,34]. Naringenina e quercetina também apresentam atividade ansiolítica em zebrafish [35,36]. Além disso, outras espécies da família Verbenaceae demonstram potencial ansiolítico pelo paradigma claro-escuro [37].



**Figura 4.** Efeito dos óleos essenciais e extratos etanólicos de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracillis* sob o comportamento de ansiedade de zebrafish adulto no Teste claro e escuro (0–5 min). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média para 6 animais/grupo; ANOVA seguido pelo teste de Tukey (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , vs. controle). LaEO: óleo essencial de *Lippia alba*; LsEO: óleo essencial de *Lippia sidoides*; LgEO: óleo essencial de *Lippia gracilis*; LaEE: extrato etanólico de *Lippia alba*; LsEE: extrato etanólico de *Lippia sidoides*; LgEE: Extrato etanólico de *Lippia gracilis*; DZP: Diazepam.

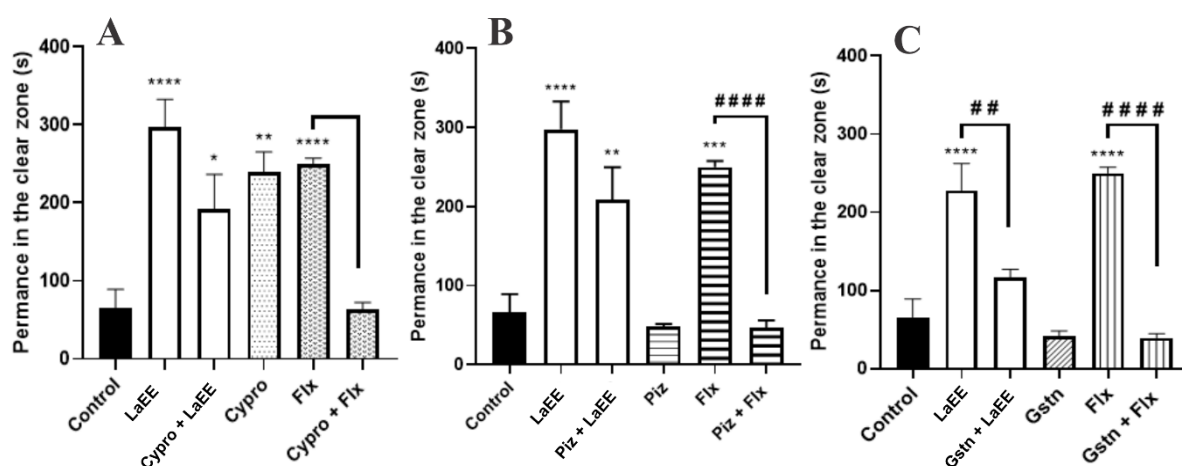
O mecanismo de ansiedade via neurotransmissão GABAérgica foi realizado através do pré-tratamento com Fmz. Este bloqueou o efeito ansiolítico dos animais tratados com todas as amostras, exceto LaEE (Figura 5), pois os peixes passaram maior parte do tempo na região escura do aquário evidenciando comportamento de ansiedade, demonstrando que efeito ansiolítico das amostras possui relação com o receptor GABA<sub>A</sub> na região de ligação dos BZD. O Fmz é responsável por antagonizar os efeitos dos BZD, tem perfil de seletividade na subunidade  $\alpha$  semelhante ao DZP no receptor GABA<sub>A</sub> [38]. Estudos mostram a ação de óleos essenciais de *L. alba* nos receptores GABAérgicos de zebrafish e silver catfish como ansiolíticos e anestésicos [39,40].



**Figura 5.** Mecanismo de ação GABAérgica dos óleos essenciais e extratos etanólicos de de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracillis* sob o comportamento de ansiedade de zebrafish adulto no Teste

claro e escuro (0–5 min). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média para 6 animais/grupo; two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey (\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , vs. controle; #  $p < 0,05$ , ###  $p < 0,0001$  vs DZP ou *Lippia*). LaEO: óleo essencial de *Lippia alba* (4 mg/kg); LsEO: óleo essencial de *Lippia sidoides* (4 mg/kg); LgEO: óleo essencial de *Lippia gracilis* (40 mg/kg); LaEE: extrato etanólico de *Lippia alba* (400 mg/kg); LsEE: extrato etanólico de *Lippia sidoides* (400 mg/kg); LgEE: Extrato etanólico de *Lippia gracilis* (400 mg/kg); DZP: Diazepam (4 mg/kg); Fmz: Fumazenil (4 mg/kg).

Devido LaEE não ter apresentado relação com o receptor GABA<sub>A</sub> na região de ligação dos BZD, o mecanismo de ansiedade via neurotransmissão serotoninérgica foi investigado utilizando os antagonistas ciproheptadina, pizotifeno e granisetron. O pré-tratamento com granisetron bloqueou o efeito ansiolítico de LaEE (Figura 6), indicando que a ação do extrato pode estar envolvida com a neuromodulação dos receptores 5-HT<sub>3A/3B</sub>. O pré-tratamento com pizotifeno e ciproheptadina não bloquearam o efeito ansiolítico do extrato, diferentemente da fluoxetina que teve seu efeito ansiolítico revertido por todos os antagonistas serotoninérgicos investigados.



**Figura 6.** Efeito do extrato etanólico de *L. alba* após pré-tratamento com ciproheptadina (A), pizotifeno (B) e granisetron (C) em zebrafish adulto no teste claro/escuro (0-5 min). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média para 6 animais/grupo; two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , vs. controle; #  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,0001$  vs Flx ou *Lippia*). LaEE: extrato etanólico de *Lippia alba* (400 mg/kg); Cypro: ciproheptadina (32 mg/kg); Piz: pizotifeno (32 mg/kg); Gstrn: granisetron (20 mg/kg); Flx: Fluoxetina (0,05 mg/kg).

Muitos neurotransmissores, como serotonina (5-HT), dopamina (DA) e ácido gama-aminobutírico (GABA), regulam as ações dos neurônios que governam comportamentos [41,42]. Altos níveis de 5-HT podem induzir efeitos semelhantes à ansiedade, enquanto baixos níveis de 5-HT causam comportamento ansiolíticos em peixe-zebra [43]. O 5-HT<sub>R3</sub> está localizado nas regiões do cérebro que regulam o humor e as emoções e, portanto, pode haver associação entre o 5-HT<sub>R3</sub> e comportamento ansiolítico/antidepressivo [18]. O extrato aquoso de *L. multiflora* Moldenke, rico em flavonoides, também apresentou efeito ansiolítico mediado pelos receptores serotoninérgicos, como 5-HT<sub>2C/2B</sub>, 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A/2C</sub> [44].

#### 4. Conclusão

Os óleos essenciais e extratos estudados apresentaram atividade antibacteriana, especialmente *L. sidoides* apresentando menores valores de CIM, enquanto *L. alba* apresentou os melhores efeitos sinérgicos. As amostras não apresentaram efeito tóxico, demonstrando uso seguro destas. Além disso, todos os óleos essenciais e os extratos causaram comportamento ansiolítico nos animais, demonstrando ocorrer interação com o receptor GABA<sub>A</sub> e 5-HT, sendo este o primeiro relato desta atividade para os três extratos e óleos essenciais de *L. sidoides* e *L. gracilis* neste modelo. Essas novas evidências farmacológicas abrem horizontes para abordagens terapêuticas a serem investigadas buscando relacionar as atividades apresentadas com a composição e seu potencial nas terapias ansiolítica e antibacteriana, assim como em seu uso como conservante alimentar.

#### Referências

1. WHO *Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates*; World Health Organization: Geneva, 2017;
2. Griessner, J.; Pasięka, M.; Böhm, V.; Grössl, F.; Kaczanowska, J.; Pliota, P.; Kargl, D.; Werner, B.; Kaouane, N.; Strobelt, S.; et al. Central Amygdala Circuit Dynamics Underlying the Benzodiazepine Anxiolytic Effect. *Mol. Psychiatry* **2021**, *26*, 534–544, doi:10.1038/s41380-018-0310-3.
3. Vossen, L.E.; Cervený, D.; Österkrans, M.; Thörnqvist, P.O.; Jutfelt, F.; Fick, J.; Brodin, T.; Winberg, S. Chronic Exposure to Oxazepam Pollution Produces Tolerance to Anxiolytic Effects in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54*, 1760–1769, doi:10.1021/acs.est.9b06052.
4. MacLean, R.C.; Millan, A.S. The Evolution of Antibiotic Resistance. *Science* **2019**, *365*, 1082–1083, doi:10.1126/science.aax3879.

5. Akova, M. Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Bloodstream Infections. *Virulence* **2016**, *7*, 252–266, doi:10.1080/21505594.2016.1159366.
6. Frieri, M.; Kumar, K.; Boutin, A. Antibiotic Resistance. *J. Infect. Public Health* **2017**, *10*, 369–378, doi:10.1016/j.jiph.2016.08.007.
7. Fedotova, J.; Kubatka, P.; Büsselberg, D.; Shleikin, A.G.; Caprnda, M.; Dragasek, J.; Rodrigo, L.; Pohanka, M.; Gasparova, I.; Nosal, V.; et al. Therapeutical Strategies for Anxiety and Anxiety-like Disorders Using Plant-Derived Natural Compounds and Plant Extracts. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *95*, 437–446, doi:10.1016/j.biopha.2017.08.107.
8. Garcia-Oliveira, P.; Barral, M.; Carpena, M.; Gullón, P.; Fraga-Corral, M.; Otero, P.; Prieto, M.A.; Simal-Gandara, J. Traditional Plants from Asteraceae Family as Potential Candidates for Functional Food Industry. *Food Funct.* **2021**, *12*, 2850–2873, doi:10.1039/d0fo03433a.
9. Ombito, J.O.; Salano, E.N.; Yegon, P.K.; Ngetich, W.K.; Mwangi, E.M. A Review of the Chemistry of Some Species of Genus *Lippia* (Verbenaceae Family). *J. Sci. Innov. Res.* **2014**, *3*, 460–466.
10. Siqueira-Lima, P.S.; Passos, F.R.S.; Lucchese, A.M.; Menezes, I.R.A.; Coutinho, H.D.M.; Lima, A.A.N.; Zengin, G.; Quintans, J.S.S.; Quintans-Júnior, L.J. Central Nervous System and Analgesic Profiles of *Lippia* Genus. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2019**, *29*, 125–135.
11. Nonato, C.F.A.; Camilo, C.J.; Leite, D.O.D.; Nobrega, M.G.L.A.; Ribeiro-Filho, J.; Menezes, I.R.A.; Tavares, J.F.; Costa, J.G.M. Comparative Analysis of Chemical Profiles and Antioxidant Activities of Essential Oils Obtained from Species of *Lippia* L. by Chemometrics. *Food Chem.* **2022**, *384*, 132614, doi:10.1016/j.foodchem.2022.132614.
12. CLSI *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; 28th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2018; ISBN 156238838X.
13. Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.M.; Lima, E.O.; Falcão-Silva, V.S.; Siqueira-Júnior, J.P. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia Coli* by *Mentha Arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy* **2008**, *54*, 328–330, doi:10.1159/000151267.
14. Sobral, A.M.F.; Andreza, R.S.; Alves, E.F.; Cruz, J.A.F.; Talita, A.; Sousa, T.A.L.; Oliveira, C.D.M.; Tintino, S.R.; Aquino, E.A.; Lima, L.F. Atividade Antibacteriana e Moduladora in Vitro de Extrato Metanólico e Hexânico de *Beta Vulgaris* Spp. (Linnaeus). *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2016**, *21*, 20–30.
15. OECD Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Testing, Section 2: Effects on Biotic Systems.



- Guidel. Test. Chem.* **2019**, 10.
16. Assessment, R.; Case, P.; Arellano-aguilar, O.; Montero-montoya, R.D. Use of the Zebrafish Embryo Toxicity Test for Use of the Zebrafish Embryo Toxicity Test for Risk Assessment Purpose : Case Study. **2015**.
  17. Magalhães, F.E.A.; de Sousa, C.Á.P.B.; Santos, S.A.A.R.; Menezes, R.B.; Batista, F.L.A.; Abreu, Â.O.; de Oliveira, M.V.; Moura, L.F.W.G.; Raposo, R. da S.; Campos, A.R. Adult Zebrafish ( *Danio Rerio* ): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. *Zebrafish* **2017**, 00, zeb.2017.1436, doi:10.1089/zeb.2017.1436.
  18. Gonçalves, N.G.G.; de Araújo, J.I.F.; Magalhães, F.E.A.; Mendes, F.R.S.; Lobo, M.D.P.; Moreira, A.C. de O.M.; Moreira, R. de A. Protein Fraction from Artocarpus Altilis Pulp Exhibits Antioxidant Properties and Reverses Anxiety Behavior in Adult Zebrafish via the Serotonergic System. *J. Funct. Foods* **2020**, 66, 103772, doi:10.1016/j.jff.2019.103772.
  19. Gebauer, D.L.; Pagnussat, N.; Piato, Â.L.; Schaefer, I.C.; Bonan, C.D.; Lara, D.R. Effects of Anxiolytics in Zebrafish: Similarities and Differences between Benzodiazepines, Buspirone and Ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2011**, 99, 480–486, doi:10.1016/j.pbb.2011.04.021.
  20. Benneh, C.K.; Biney, R.P.; Mante, P.K.; Tandoh, A.; Adongo, D.W.; Woode, E. Maerua Angolensis Stem Bark Extract Reverses Anxiety and Related Behaviours in Zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT Systems. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, 207, 129–145, doi:10.1016/j.jep.2017.06.012.
  21. Kachur, K.; Suntres, Z. The Antibacterial Properties of Phenolic Isomers, Carvacrol and Thymol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, 60, 3042–3053, doi:10.1080/10408398.2019.1675585.
  22. Saraiva, C.R.N.; Nonato, C.F.A.; Camilo, C.J.; Araújo, A.C.J.; Rodrigues, F.F.G.; Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.M. Chemical Profile and Inhibition of MDR Bacteria by the Essential Oil of *Laurus Nobilis* L. and Its Major Compound 1,8-Cineol. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2021**, 36, 102148, doi:10.1016/j.bcab.2021.102148.
  23. Veras, H.N.H.; Campos, A.R.; Rodrigues, F.F.G.; Botelho, M.A.; Coutinho, H.D.M.; Menezes, I.R.A.; Costa, J.G.M. Enhancement of the Antibiotic Activity of Erythromycin by Volatile Compounds of *Lippia Alba* (Mill.) N.E. Brown against *Staphylococcus Aureus*. *Pharmacogn. Mag.* **2011**, 7, 334–337, doi:10.4103/0973-1296.90415.
  24. Veras, H.N.H.; Rodrigues, F.F.G.; Botelho, M.A.; Menezes, I.R.A.; Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.M. Enhancement of Aminoglycosides and  $\beta$ -Lactams Antibiotic Activity by Essential Oil of *Lippia Sidoides* Cham. and the Thymol. *Arab. J. Chem.* **2017**, 10,

- S2790–S2795, doi:10.1016/j.arabjc.2013.10.030.
25. Costa, R.A.; Cavalcante, T.T.A.; Melo, C.T. V.; Barroso, D.L.A.; Melo, H.M.; Carvalho, M.G.; Catunda-Júnior, F.E.A. Antioxidant and Antibacterial Activities of Essential Oil of *Lippia Sidoides* against Drug-Resistant *Staphylococcus Aureus* from Food. *African J. Biotechnol.* **2018**, *17*, 232–238, doi:10.5897/AJB2017.16355.
  26. Souza, R.C.; Costa, M.M.; Baldisserotto, B.; Heinzmann, B.M.; Schmidt, D.; Caron, B.O.; Copatti, C.E. Antimicrobial and Synergistic Activity of Essential Oils of *Aloysia Triphylla* and *Lippia Alba* against *Aeromonas Spp.* *Microb. Pathog.* **2017**, *113*, 29–33, doi:10.1016/j.micpath.2017.10.013.
  27. Farhadi, F.; Khameneh, B.; Iranshahi, M.; Iranshahy, M. Antibacterial Activity of Flavonoids and Their Structure–Activity Relationship: An Update Review. *Phyther. Res.* **2019**, *33*, 13–40, doi:10.1002/ptr.6208.
  28. Costa, M.S.; Rocha, J.E.; Campina, F.F.; Silva, A.R.P.; Cruz, R.P.; Pereira, R.L.S.; Quintans-Júnior, L.J.; Menezes, I.R.A.; Araújo, A.A.S.; Freitas, T.S.; et al. Comparative Analysis of the Antibacterial and Drug-Modulatory Effect of d-Limonene Alone and Complexed with  $\beta$ -Cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *128*, 158–161, doi:10.1016/j.ejps.2018.11.036.
  29. Gupta, P.; Khobragade, S.; Rajaram, S.; Shingatgeri, V. Assessment of Locomotion Behavior in Adult Zebrafish after Acute Exposure to Different Pharmacological Reference Compounds. *Drug Dev. Ther.* **2014**, *5*, 127, doi:10.4103/2394-2002.139626.
  30. Ferreira, M.K.A.; Da Silva, A.W.; dos Santos Moura, A.L.; Sales, K.V.B.; Marinho, E.M.; Cardoso, J.N.M.; Marinho, M.M.; Bandeira, P.N.; Magalhães, F.E.A.; Marinho, E.S.; et al. Chalcones Reverse the Anxiety and Convulsive Behavior of Adult Zebrafish. *Epilepsy Behav* **2021**, *117*, 107881, doi:10.1016/j.yebeh.2021.107881.
  31. Maximino, C.; da Silva, A.W.B.; Gouveia, A.; Herculano, A.M. Pharmacological Analysis of Zebrafish (*Danio Rerio*) Scototaxis. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **2011**, doi:10.1016/j.pnpbp.2011.01.006.
  32. Parente, M.S.R.; Custódio, F.R.; Cardoso, N.A.; Lima, M.J.A.; De Melo, T.S.; Linhares, M.I.; Siqueira, R.M.P.; Do Nascimento, A.Á.; Catunda Júnior, F.E.A.; De Melo, C.T.V. Antidepressant-Like Effect of *Lippia Sidoides* CHAM (Verbenaceae) Essential Oil and Its Major Compound Thymol in Mice. *Sci. Pharm.* **2018**, *86*, Page 27 **2018**, *86*, 27, doi:10.3390/SCIPHARM86030027.
  33. Bianchini, A.E.; Garlet, Q.I.; Da Cunha, J.A.; Bandeira Junior, G.; Brusque, I.C.M.; Salbego, J.; Heinzmann, B.M.; Baldisserotto, B. Monoterpenoids (Thymol, Carvacrol and S-(+)-Linalool) with Anesthetic Activity in Silver Catfish (*Rhamdia Quelen*):

- Evaluation of Acetylcholinesterase and GABAergic Activity. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2017**, *50*, 1–8, doi:10.1590/1414-431x20176346.
34. Castañeda, R.; Cáceres, A.; Velásquez, D.; Rodríguez, C.; Morales, D.; Castillo, A. Medicinal Plants Used in Traditional Mayan Medicine for the Treatment of Central Nervous System Disorders: An Overview. *J. Ethnopharmacol.* **2022**, *283*, 114746, doi:10.1016/j.jep.2021.114746.
  35. Nachammai, V.; Jeyabalan, S.; Muthusamy, S. Anxiolytic Effects of Silibinin and Naringenin on Zebrafish Model: A Preclinical Study. *Indian J. Pharmacol.* **2021**, *53*, 457–464, doi:10.4103/ijp.IJP\_18\_20.
  36. Zhang, J.; Liu, M.; Cui, W.; Yang, L.; Zhang, C. Quercetin Affects Shoaling and Anxiety Behaviors in Zebrafish: Involvement of Neuroinflammation and Neuron Apoptosis. *Fish Shellfish Immunol.* **2020**, *105*, 359–368, doi:10.1016/j.fsi.2020.06.058.
  37. Melo, N.C.; Sánchez-Ortiz, B.L.; Sampaio, T.I.S.; Pereira, A.C.M.; Silva-Neto, F.L.P.; Silva, H.R.; Cruz, R.A.S.; Keita, H.; Pereira, A.M.S.; Carvalho, J.C.T. Anxiolytic and Antidepressant Effects of the Hydroethanolic Extract from the Leaves of *Aloysia Polystachya* (Griseb.) Moldenke: A Study on Zebrafish (*Danio Rerio*). *Pharmaceuticals* **2019**, *12*, doi:10.3390/ph12030106.
  38. Müller Herde, A.; Benke, D.; Ralvenius, W.T.; Mu, L.; Schibli, R.; Zeilhofer, H.U.; Krämer, S.D. GABAA Receptor Subtypes in the Mouse Brain: Regional Mapping and Diazepam Receptor Occupancy by in Vivo [18F]Flumazenil PET. *Neuroimage* **2017**, *150*, 279–291, doi:10.1016/j.neuroimage.2017.02.022.
  39. Heldwein, C.G.; Silva, L.L.; Reckziegel, P.; Barros, F.M.C.; Bürger, M.E.; Baldisserotto, B.; Mallmann, C.A.; Schmidt, D.; Caron, B.O.; Heinzmann, B.M. Participation of the GABAergic System in the Anesthetic Effect of *Lippia Alba* (Mill.) N.E. Brown Essential Oil. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2012**, *45*, 436–443, doi:10.1590/S0100-879X2012007500052.
  40. Bandeira-Junior, G.; Abreu, M.S.; Rosa, J.G.S.; Pinheiro, C.G.; Heinzmann, B.M.; Baldisserotto, B.; Barcellos, L.J.G. *Lippia Alba* and *Aloysia Triphylla* Essential Oils Are Anxiolytic without Inducing Aversiveness in Fish. *Aquaculture* **2018**, *482*, 49–56, doi:10.1016/j.aquaculture.2017.09.023.
  41. Handley, S.L. 5-Hydroxytryptamine Pathways in Anxiety and Its Treatment. *Pharmacol. Ther.* **1995**, *66*, 103–148, doi:10.1016/0163-7258(95)00004-Z.
  42. Jia, M.; Pittman, J. Deficits in Striatal Dopamine and Hippocampal Serotonin Following Induction of Anxiety/Depressive-Like Behaviors by Bisphenol A. *Arch. Neurosci.* **2014**, *2*, 1–6, doi:10.5812/archneurosci.18555.

43. Nowicki, M.; Tran, S.; Muraleetharan, A.; Markovic, S.; Gerlai, R. Serotonin Antagonists Induce Anxiolytic and Anxiogenic-like Behavior in Zebrafish in a Receptor-Subtype Dependent Manner. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2014**, *126*, 170–180, doi:10.1016/j.pbb.2014.09.022.
44. Ngaibi, J.; Taiwe, G.S.; Njapdounke, J.S.K.; Bigued; Nguezeze, Y.; Sidiki, N.; Bum, E.N. Potential of an Aqueous Extract of *Lippia Multiflora* Moldenke (Verbenaceae) in the Treatment of Anxiety Disorders: Possible Involvement of Serotonergic Transmission. *GSC Biol. Pharm. Sci.* **2021**, *14*, 277–289, doi:10.30574/gscbps.2021.14.3.0079.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Lippia* é amplamente reconhecido por seu valor terapêutico e usos tradicionais, tendo várias atividades farmacológicas reconhecidas. Apesar disso, poucos os estudos que relatam a composição química não-volátil ou relacionam as composições de suas espécies.

Os resultados obtidos mostraram perfil químico dos óleos essenciais ricos em monoterpenos, porém sem relação entre as espécies estudadas. Os extratos mostraram-se ricos em compostos fenólicos, com predominância da classe dos flavonoides. Estes apresentaram baixa similaridade, com possíveis marcadores químicos destacados para o gênero, como a naringenina e cirsimarina.

Os óleos essenciais apresentam atividade antioxidante relevante, estando esta, relacionada ao potencial de compostos distintos, sem ligação direta com as suas composições majoritárias. Os extratos etanólicos demonstraram potencial antioxidante, ganhando destaque pelo mecanismo de quelação de  $Fe^{2+}$ , seguido pelos mecanismos de co-oxidação do ácido linoleico, redução do  $Fe^{3+}$  e DPPH. Além disso, estes apresentaram atividade inibidora de enzima acetilcolinesterase, com concentrações clinicamente relevantes.

Os óleos essenciais e os extratos etanólicos apresentaram atividade antibacteriana e efeito sinérgico significativo, demonstrando possibilidade de uso dos seus constituintes associados a antibióticos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas multirresistentes.

Apesar das espécies serem bastante conhecidas, o efeito ansiolítico das amostras em Zebrafish, por neurotransmissão via  $GABA_A$  e do extrato de *L. alba* via serotoninérgica, é o primeiro relato desta atividade para os três extratos e óleos essenciais de *L. sidoides* e *L. gracilis* neste modelo.

Diante disso, as espécies estudadas mostram potencial terapêutico contra doenças neurodegenerativas e nas terapias ansiolítica e antibacteriana, como também como conservante alimentar. Estes dados servem de base para estudos que busquem estudar os mecanismos associados as atividades, isolar e caracterizar seus compostos, bem como suas aplicabilidades na indústria alimentícia.

**APÊNDICES**

**Apêndice 1.** Composição volátil do gênero *Lippia* L.

Espécie	Parte da planta	Compostos identificados	Autor
<i>L. alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson	Folhas	<p> <math>\delta</math>-Cadineno; (E)-Cariofileno; Óxido de cariofileno; Geraniol; Acetato de Geranila; Germacreno D; 6-metil-Hept-5-en-2-ona; Linalol; Mirceno; Neral; Nerol; Tuja-2,4(10)-diene; Vinil amil carbinol; <math>\alpha</math>-pineno; <math>\beta</math>-pineno; limoneno; Z-ocimeno; E-ocimeno; trans-carveol; carvona; piperitona; <math>\alpha</math>-copaeno; <math>\beta</math>-bourboneno; <math>\beta</math>-elemeno; <math>\alpha</math>-humuleno; aloaromadendreno; <math>\gamma</math>-muurolene; <math>\alpha</math>-muurolene; <math>\gamma</math>-cadineno; espatulenol; Cis-3-hexenol; 1-octen-3-ol; 6-methyl-5-hepten-2-one; Trans-<math>\beta</math>-ocimene; Myrtenol; Trans-p-mentha-2,8-dien-1-ol; Cis-epoxy-ocimene; Trans-verbenol; Citronelal; Cis-carveol; Trans-geraniol; Eugenol; <math>\beta</math>-cubebene; Methyl eugenol; Trans-<math>\beta</math>-farnezeno; <math>\alpha</math>-amorfenol; Valencene; Cis-nerolidol; Trans-nerolidol; Cis-<math>\alpha</math>-santalol; 8-oxoneoisolongifolene; 15-copaenol; Trans-<math>\alpha</math> sesqui ciclogeraniol; Canfeno; Sabineno; Ocimeno; Terpinen-4-ol; trans-óxido de carvona; Timol; Carvacrol; Elemeno; Copaene; Geranilacetona; 9-epi-cariofileno; Propanoato de Geraniol; Germacreno A; Biciclogermacreno; 10-epi-cubebol; Éter trans-cadineno; Germacren D-4-ol; 6-metil-5-hepten-2-ol; 1,8-cineol; (Z)-<math>\beta</math>-ocimeno; (E)-<math>\beta</math>-ocimeno; (Z)-óxido de linalol; óxido de (E)-linalol; (E)-<math>\beta</math>-cariofileno; (E)-<math>\beta</math>-farneseno; germacreno B; p-cimeno; hidrato de (Z)-sabineno; 6,7-epoximirceno; (E)-hidrato de sabineno; perileno; 1,3,8-p-mentatrieno; <math>\alpha</math>-campholenal; trans-pinocarveol; (Z)-isocitral; </p>	<p> (ALVES et al., 2015; BATISTA et al., 2018; BRITO et al., 2021; FIKADU; YAYA; CHANDRAVANSI, 2022; FONTANA et al., 2021; GIMENES et al., 2021; GODOY et al., 2020; KAMPKE et al., 2018; LIMA et al., 2016; MIURA et al., 2021; MOTA; DANTAS; FROTA, 2018; MOTA et al., 2022; NONATO et al., 2022; POSSAMAI et al., 2019; SILVA et al., 2017a; TONI et al., 2015) </p>

pinocarvona;  $\delta$ -terpineol; epóxido de rosafurano; (E)-isocitral;  $\alpha$ -terpineol; verbena (Z)-p-menta-1(7),8-dien-2-ol; 2,3-epóxi-geranial; acetato de isobornila; acetato de mirtenila;  $\beta$ -copaneno;  $\alpha$ -guaieno;  $\alpha$ -muuroleno; (E)- $\beta$ -guaieno;  $\beta$ -bisaboleno;  $\alpha$ -bulneseno;  $\delta$ -amorfenol;  $\delta$ -cadineno; (E)-nerolidol; espatulanol; epóxido de humuleno II; 1,10-di-epi-cubenol; alo-epóxido aromadendreno; khusilal; pogostol; (E)-14-hidroxi-9-epi-cariofileno; cis-thujopsenal; 6-Etil-5-hepten-2-ona; Cis-Citral;  $\alpha$ -Limoneno;  $\gamma$ -Terpineno; Sulcatone; Cânfora; trans-Cariofileno; Germacreno; Elemol; Nerolidol; Guaiol;  $\beta$ -Eudesmol; Hedicariol; (Z)-Hex-3-enal; 4-Hidroxi-4-metilpentan-2-ona; (E)-Hex-2-enal; (Z)-Hex-3-en-1-ol; Hexan-1-ol;  $\alpha$ -Tujeno; Oct-1-en-3-ol; b-Mirceno; (Z)-Hex-3-enilo acetato;  $\alpha$ -Terpineno; hidrato de cis-Sabineno; hidrato de trans-Sabineno; b-Citronelal; cis-Dihidrocarvona; trans-dihidrocarvona; b-Citronelol; 6-epi-a-Cubebeno; b-Cariofileno; cis-Muurola-4(14),5-dieno;  $\alpha$ -Curcumeno; Zingibereno; Cadineno;  $\delta$ -Murulene;  $\omega$ -3-careno; mirtenal; 2-hexenal; 3-octanol; Isopulegol; 4-terpineol; Citronelol;  $\beta$ -citral; cis-geraniol;  $\alpha$ -citral; P-cymen-2-ol;  $\beta$ -farneseno;  $\delta$ -guaiene; eudesm-7(11)-en-4-ol; 6-Metil-5-hepten-2-ona; L-pinocarveol; p-cimeno-2-ol; 2-Pinen-10-ol;  $\alpha$ -Cubebeno; Naftaleno; Eucaliptol;  $\alpha$ -Pironeno;  $\beta$ -Ylangene; Isogermacreno D;  $\epsilon$ -Muurolene;  $\beta$ -Copaeno; Tau ( $\eta$ )-muuralol; endoborneol.



	Folhas e inflorescências	1-octen-3-ol; Limoneno; (E)- $\beta$ -Ocimeno; trans-p-Menta-2,8-dienol; Borneol; Piperitona; óxido de cis-piperitona; $\delta$ -Diosfenol; 4-Hidroxipiperitona; Timol; Diosfenol; Piperitenona; epóxido de piperitenona; $\alpha$ -Cubebeno; $\alpha$ -Copaeno; $\beta$ -bourboneno; $\beta$ -Cubebeno; $\beta$ -elemeno; (E)- $\beta$ -Cariofileno; $\beta$ -Copaeno; (E)-farneseno; alo-Aromadendreno; Germacreno D; epi-Cubebol; Bicyclgermacreno; $\alpha$ -Muurolele; $\alpha$ -farneseno; Cubebol; $\delta$ -Cadineno; $\alpha$ -Cadinol; Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 $\alpha$ -ol; $\alpha$ -tujeno $\alpha$ -pineno; benzaldeído; $\beta$ -pineno; mirceno; $\alpha$ -felandreno; $\alpha$ -terpineno; p-cimeno; cis-ocimeno; trans-ocimeno; c-terpineno; cis-sabineno; hidrato de p-cimeno; epóxi mirceno; linalol; cânfora; metil canfeniol; 4-terpineol; trans-dihidrocarvona; álcool $\beta$ -fenquílico; Nerol; éter timol metílico; neral; geraniol; geranial; acetato de bornilo; eugenol; ciclosativeno; $\beta$ -elemeneno; $\beta$ -cariofileno; $\beta$ -gurjuneno; aromadendreno; $\alpha$ -humuleno; c-muurolele; $\beta$ -selineno; $\alpha$ -selineno; $\alpha$ -muurolele; c-cadineno; d-cadineno; óxido de cariofileno; óxido de humuleno.	(MAJOLO et al., 2017; MUÑOZ-ACEVEDO et al., 2019)
	Folhas secas	Sabineno; Sulcatone; Mirceno; p-Cimeno; Limoneno; (Z)- $\beta$ -Ocimeno; y-Terpineno; Linalol; (E)-Isocitral; Neral; Carvona; Geranial; cis-Muurolele-4(14).5-dieno; Elemol; (E)-Nerolidol; $\beta$ -Eudesmol.	(GOMES et al., 2022; SOUZA et al., 2017a)
	Planta inteira	Limoneno; $\beta$ -bourbonona; germacreno D; carvona; piperitenona; trans-p-cariofileno; neral; geranial; geraniol.	(CÁCERES et al., 2020)

<i>L. gracilis</i> Schauer	Brotos	$\alpha$ -tujeno; $\alpha$ -pineno; $\beta$ -Mirceno; $\alpha$ -Terpineno; p-Cimeno; Limoneno; 1,8-Cineol; $\gamma$ -Terpineno; Linalol; Terpineno-4-ol; Metil-timol; Timol; Carvacrol; $\beta$ -cariofileno; $\alpha$ -humuleno; Viridifloreno; Biciclogermacreno; Espatuleno; Oxi-Cariofileno.	(SILVA et al., 2019a)
	Folhas	$\alpha$ -tujeno; $\alpha$ -pineno; canfeno; $\beta$ -pineno; $\alpha$ -terpineno; p-cimeno; 1,8-cineol; $\gamma$ -terpineno; ipsdienol; cânfora; terpineno-4-ol; $\alpha$ -terpineol; trans-carveol; éter metil timol; timol; carvacrol; $\alpha$ -copaeno; E-cariofileno; $\alpha$ -humuleno; $\gamma$ -cadineno; óxido de cariofileno; sabineno; mirceno; trans-Pinocarveol; $\delta$ -Terpineol; Terpinen-4-ol; (E)- $\beta$ -Cariofileno; limoneno; hidrato de cis-sabineno; $\beta$ -cariofileno; acetato de carvacrol; santolinatrieno; triciclona; $\alpha$ -Fenchene; Tuja-2,4(10)-dieno; $\alpha$ -felandreno; (Z)- $\beta$ -Ocimeno; Terpinoleno; Linalol; endo-Fenchol; hidrato de trans-pineno; hidrato de canfeno; Pinocarvona; Borneol; Mirtenol; acetato de isobornilo; acetato de mirtenilo; $\gamma$ -Maalieno; $\alpha$ -Maalieno; Aromadendrene; Miltail-4(12)-eno; 9-epi-(E)-Cariofileno; Viridifloreno; $\alpha$ -Agarofurano; Esfatulenol; 10-epi- $\gamma$ -Eudesmol; Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5- $\alpha$ -ol ou Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5- $\beta$ -ol; Agarospirol; $\beta$ -Eudesmol; $\alpha$ -Eudesmol; 14-hidroxi-9-epi-(E)-Cariofileno; $\beta$ -Mirceno; $\beta$ -Ocimeno; $\alpha$ -Ocimeno; 4-terpineol; éter metílico de carvacrol; biciclogermacreno; Espatuleno; 3- $\delta$ -Careno; (E)-4-Tujanol; $\delta$ -Elemeno; Acetato de timol; (E)- $\alpha$ -bergamoteno; $\delta$ -Cadineno; Carvacril acetinado; (E)-metil-Cinamato; eucaliptol.	(BITU et al., 2015; DIAS et al., 2015; LAZZARINI et al., 2019; MELO et al., 2019; MIURA et al., 2021; MONTEIRO et al., 2021a; OLIVEIRA et al., 2020; SANTOS et al., 2016, 2019; SILVA et al., 2022)

	Folhas secas	$\alpha$ -pineno; $\alpha$ -Tujeno; Mirceno; $\rho$ -Cimeno; $\delta$ -2-Careno; 1,8-Cineol; $\gamma$ -Terpineno; Linalol; Bornel; Terpinen-4-ol; Timol; Carvacrol; (Z)-Cariofileno; hidroxianisol butilado; Bicyclogermacreno; Espatuleno; Óxido de cariofileno; ar-Curcumeno; $\alpha$ -Zingibereno; $\alpha$ -felandreno; $\alpha$ -terpineno; Limoneno; hidrato de cis-sabineno; hidrato de trans-sabineno; Ipsdieol; acetato de carvacrol; E-cariofileno; $\alpha$ -trans-bergamoteno; $\alpha$ -humuleno; 2',5'-dimetoxiacetofenona; $\alpha$ -bulneseno; $\beta$ -bisaboleno; Éter timol metílico; $\beta$ -Cariofileno; canfeno; Sabineno; $\beta$ -pineno; 3- $\delta$ -Careno; hidrato de (Z)-Sabineno; Cânfora; Metil carvacrol; $\delta$ -elemeno; $\alpha$ -E-bergamoteno; Aromadendreno; Mentol; terpineno-4-ol; Viridifloreno.	(ALMEIDA et al., 2018; BITU et al., 2015; GALVÃO et al., 2019; GOMES et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2021; PENHA et al., 2021; SOUZA et al., 2017c; TEODORO et al., 2021)
<i>L. grata</i> Schauer	Folhas	a-Tujeno; $\alpha$ -pineno; Sabineno; $\beta$ -pineno; Mirceno; $\alpha$ -Terpineno; $\rho$ -Cimeno; Limoneno; 1,8-Cineol; $\gamma$ -Terpineno; Terpinen-4-ol; L-a-terpineol; $\alpha$ -Terpineol; éter timol metílico; Timol; Carvacrol; acetato de timol; $\alpha$ -Copaeno; Z-cariofileno; Delta-cadineno; Óxido de cariofileno.	(FELIX et al., 2021)
	Folhas e inflorescências secas	a-tujeno; a-pineno; canfeno; $\beta$ -pineno; Mirceno; $\alpha$ -felandreno; $\Omega$ -3-Careno; a-terpineno; $\rho$ -Cimeno; o-Cimeno; $\gamma$ -Terpineno; Terpineno-4-ol; Éter metil-timol; éter metílico de carvacrol; Timol; Carvacrol; E-Cariofileno; a-humuleno; $\delta$ -Cadineno; Óxido de Cariofileno.	(BARRIGA et al., 2020)
<i>L. graveolens</i> Kunth	Folhas	Linalol; Borneol; m-Cimen-8-ol; $\rho$ -Cimen-8-ol; Metil-salicilato; Timol; Carvacrol; $\beta$ -Cariofileno; (E)- $\beta$ -farneseno; Viridifloreno; tetradecanal; t-Muurolol; Bulnesol; Epijasmonato de metila; Mirceno; Carene; $\rho$ -Cimeno; 1,8-Cineol; Limoneno; Terpinoleno; terpineol; $\alpha$ -Terpineol;	(BARBIERI et al., 2018; GONZÁLEZ-TRUJANO et al., 2017; GUEVARA

		metiltimol; Eugenol; $\alpha$ -Copaeno; $\beta$ -Humuleno; trans-bergamoteno; $\beta$ -Selineno; $\alpha$ -Selineno; $\alpha$ -Muurolene; $\Gamma$ -Cadineno; 1,S-cis-Calameneno; $\nu$ -Cadineno; (E)-Nerolidol; Óxido de cariofileno; Globulol; Viridiflorol; Guaiol; Epoxihumuleno II; $\beta$ -Eudesmol; T-Cadinol; $\alpha$ -Eudesmol; $\alpha$ -Cadinol; acetato de carvacrol; canfeno; Micreno; $\gamma$ -Terpineno; cis-p-Menta-1(7),8-dien-2-ol.	et al., 2018; LEYVA-LÓPEZ et al., 2016)
	Ramos	2-metilbutanoato de etilo; Sabineno; $\alpha$ -Tujeno; ( $\pm$ )- $\alpha$ -pineno; $\beta$ -Tujeno; canfeno; ( $\pm$ )- $\beta$ -pineno; $\beta$ -pineno; $\alpha$ -felandreno; ( $\pm$ )-3-Careno; ( $\pm$ )- $\alpha$ -terpinil acetato; p-Cimeno; ( $\pm$ )-Eucaliptol; Ocimeno; $\alpha$ -Terpineno; Cis-( $\pm$ )-4-tujanol; 2-Carene; ( $\pm$ )-Linalol; ( $\pm$ )-Cânfora; (+)-Borneol; ( $\pm$ )-4-Terpineol; ( $\pm$ )- $\alpha$ -Terpineol; 1-isopropil-2-metoxi-4-metilbenzeno; Carvotanacetona; Carvacrol; p-timol; Timol; (-)- $\beta$ -Cariofileno; $\alpha$ -Cariofileno; $\Upsilon$ -Muurolene; $\alpha$ -Eudesmol.	(MEDINA-ROMERO et al., 2021)
<i>L. hirta</i> (Cham.) Meisn. ex Walp.	Partes aéreas	Carvacrol; Carvona; D-Limoneno; Mirceno; $\alpha$ -pineno; $\alpha$ -Terpineno; $\gamma$ -Terpineno; 1,4-Cineol; p-Cimeno; Terpinoleno.	(OLIVEIRA et al., 2019a)
<i>L. integrifolia</i> (Griseb.) Hieron.	Folhas e inflorescência	$\alpha$ -Pineno; (5H)-furanona-5,5-dimetilo; $\alpha$ -Felandreno; p-Cimeno; Limoneno; hidrato de cis-Sabineno; hidrato de trans-Sabineno; Cânfora; Borneol; trans-Piperitol; African-5-eno; Africano-1,5-dieno; $\beta$ -Cariofileno; $\alpha$ -Humuleno; Germacreno-D; African-5-en-1a-ol; Biciclogermacreno; $\beta$ -bisaboleno; cis-Elemol; Lippifoli-1(6)-en-5-ona; trans-Nerolidol; trans-Davanona; Espatulenol; Óxido de cariofileno;	(MARCIAL et al., 2016)

		Fokienol; Guaiol; Lippifoli-1(6)-en-4b-ol-5-ona; Bulnesol; $\beta$ -Davanona-2-ol (trans); Integrifolian-1,5-diona; 4,5-Seco-africana-4,5-diona.	
	Partes aéreas	Davanona.	(LEAL et al., 2018)
<i>L. javanica</i> (Burm.f.) Spreng.	Folhas	$\beta$ -pineno; Mirceno; Limoneno; (Z)- $\beta$ -ocimeno; (E)- $\beta$ -ocimeno; Terpinoleno; Linalol; Mircenona; Verbenona; Carvona; Perillaldeído; Piperitenona; $\beta$ -cariofileno; Germacreno D; Biciclogermacreno; Espatuleno; Óxido de cariofileno; $\alpha$ -Tujeno; $\alpha$ -pineno; canfeno; Sabineno; $\alpha$ -felandreno; $\alpha$ -Terpineno; 1,8-Cineol; trans- $\beta$ -Ocimeno; $\gamma$ -Terpineno; hidrato de cis-Sabineno; $\alpha$ -Terpinoleno; óxido de trans-limoneno; Cânfora; Borneol; Terpineno-4-ol; $\alpha$ -Terpineol; Mirtenol; trans-Carveol; acetato de Bornilo; acetato de trans-Carvilo; $\alpha$ -Cubebeno; $\alpha$ -Copaeno; $\beta$ -bourboneno; $\beta$ -elemeno; $\beta$ -Copaeno; $\gamma$ -Elemeno; $\alpha$ -Humuleno; Aloaromadendreno; $\gamma$ -amorfenol; Cubebol; $\delta$ -Cadineno; $\alpha$ -Cadineno; Elemol; Germacreno D-4-ol.	(ENDRIS; ASFAW; BISRAT, 2015; KAMANULA et al., 2017)
<i>L. lacunosa</i> Mart. & Schauer	Partes aéreas	(E)-2-hexenol; $\alpha$ -pineno; sabineno; $\beta$ -pineno; mirceno; limoneno; (E)- $\beta$ -ocimeno; Linalol; pinocarvona; isopinocamfone; mirtenol; 2,6-dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol; acetato de mirtenila; $\delta$ -selineno; $\alpha$ -copaneno; $\beta$ -elemeno; gurjuneno; $\beta$ -cariofileno; $\alpha$ -humuleno; $\gamma$ -muuroleno; germacreno D; $\beta$ -cariofileno; $\alpha$ -muuroleno; germacreno A; $\gamma$ -cadineno; $\delta$ -cadineno; $\alpha$ -cadineno; germacreno B; germacreno-d-4-ol; óxido de cariofileno; epi- $\alpha$ -muurolol; $\alpha$ -muurolol; $\alpha$ -cadinol.	(MEDEIROS et al., 2016)

<i>L. macrophylla</i> Cham.	Folhas	Mirceno; o-Cimeno; $\gamma$ -Terpineno; Terpineno-4-ol; Timol. éter metílico; Timol; Carvacrol; acetato de timol; acetato de carvacrol; trans-Cariofileno; $\beta$ -bisaboleno; Óxido de cariofileno.	(SOUZA et al., 2017b)
<i>L. micromera</i> Schauer	Folhas	$\beta$ -Sabineno; $\beta$ -pineno; 2(10)-Pineno; $\alpha$ -felandreno; 3-Carene; (+)-4-Careno; $\beta$ -Cimeno; m-Menta-1,8-dieno; Eucaliptol; $\beta$ -Ocimeno; $\gamma$ -Terpineno; 4-Tujanol; 2-Carene; hidrato de sabineno; Linalol; $\beta$ -Damascenona; Terpinen-4-ol; $\alpha$ -Terpineol; éter metil isotimol; 2-isopropil-4-metilanol; p-timol; 3-metil, 5-propil nonano; Carvacrol; $\alpha$ -Copaeno; Cariofileno; Bergamoteno; 1,1,4,8-tetrametil-cis,cis,4,7,10-cicoundecatrieno; Heptadecano, 2,6,10,15-tetrametilo; $\delta$ -Cadineno; Epóxi de isoaromadendreno.	(BUGAYONG; CRUZ; PADILLA, 2019)
<i>L. microphylla</i> Cham.	Partes aéreas	$\alpha$ -pineno; Mirceno; $\alpha$ -Terpineno; p-Cimeno; $\gamma$ -Terpineno; p-cimeno; hidrato de trans-Sabineno; Aloocimeno; cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol; Umbeliferona; 4-Terpineol; p-Cimen-8-ol; $\alpha$ -Terpineol; O-Metiltimol; Metilcarvacrol; Timol; Carvacrol; acetato de carvacrol; acetato de timol; $\beta$ -Cariofileno; trans- $\alpha$ -bergamoteno; $\alpha$ -Humuleno; 4-hidroxianisol butilado; $\beta$ -bisaboleno; Espatulenol; Óxido de Cariofileno.	(XAVIER et al., 2015)
<i>L. multiflora</i> Moldenke	Folhas	$\alpha$ -pineno; $\alpha$ -Tujeno; Sabineno; $\alpha$ -felandreno; Limoneno; p-Cimeno; (E)- $\beta$ -Ocimeno; 1,8-Cineol; Sulcatona; Linalol; Geranial; Nerol; Geraniol; Neral; Carvacrol; $\beta$ -Cariofileno; (Z)- $\beta$ -farneseno; $\alpha$ -Humuleno; Germacreno D; $\beta$ -bisaboleno; $\delta$ -Cadineno; $\beta$ -elemeno; Óxido de cariofileno; Mirceno; $\alpha$ -terpineol; $\beta$ -felandreno; Terpinoleno; 6-Metil-5-	(ETIENNE; MOHAMED; CHRISTIANE, 2020; JOSÉ-RITA et al., 2022;

		hepten-2-ona; $\beta$ -Elemene; (E)-Nerolidol; $\beta$ -pineno; 1-octeno-3-ol; 6-Metilhept-5-en-2-ona; 3-octanol; $\alpha$ -Terpineno; (Z)- $\beta$ -Ocimeno; $\gamma$ -Terpineno; hidrato de sabineno; Menth-2-en-1-ol; Citronelal; terpineol; terpineno-4-ol; Timol; $\alpha$ -Cubebeno; acetato de timilo; Eugenol; acetato de Neril; acetato de carvacril; $\alpha$ -Copaeno; $\beta$ -bourboneno; acetato de geranilo; $\beta$ -Cubebeno; (E)- $\beta$ -farneseno; Aloaromanendreno; $\alpha$ -Muurolene; Bisaboleno; Cubebol; Cadineno; Nerolidol; Guaiol; óxido de humuleno II; Óxido de aromandendrano; epi- $\alpha$ -Cadinol; Germacra-4(15), 5,10(14)-Trien-1-ol.	KOBENAN et al., 2022; SORO et al., 2015, 2016)
	Partes aéreas	a-pineno; Mirceno; p-cimeno; Limoneno; $\gamma$ -terpineno; Ipsenona; Linalol;p-menta-trans-2,8-dien-1-ol; (E)-tagetona; Vervanol; a-terpineol; Verbenona; Trans-carveol; Neral; Citral; Carvona; Geraniol; Acetato de trans-carvil; Timol; Carvacrol; Piperitenona; Acetato de Timol; $\beta$ -cariofileno; a-humuleno; $\beta$ -farneseno; Germacreno D; Zingibereno; Hedicariol; Elemol; Óxido de cariofileno; Guaiol; Óxido de humuleno; $\delta$ -cadinol; Isopiperitenona; Carveil acetato.	(SAMBA et al., 2020)
<i>L. origanoides</i> Kunth	Folhas	$\alpha$ -Tujeno; $\alpha$ -pineno; Sabineno; $\beta$ -Pineno; Mirceno; $\alpha$ -Terpineno; p-Cimeno; 1,8-Cineol; $\gamma$ -Terpineno; $\alpha$ -Terpineol; Timol; Carvona; Carvacrol; p-Cimen-7-ol; acetato de timol; $\alpha$ -Copaeno; $\alpha$ -Cedrene; (E)-Cariofileno; $\gamma$ -elemeno; $\alpha$ -trans-bergamoteno; $\alpha$ -Humuleno; ar-Curcumeno; $\alpha$ -Zingibereno; $\alpha$ -Muurolene; $\beta$ -bisaboleno; (Z)- $\gamma$ -bisaboleno; $\sigma$ -Cadineno; Óxido de cariofileno; (E)-metil cinamato;	(ALMEIDA et al., 2016; CASTILHO et al., 2019; HERNANDES et al., 2017; LISBOA et al., 2020; MAR et al., 2018; NUNES et al., 2018;

		hedicariol; $\alpha$ -eudesmol; $\beta$ -eudesmol; canfeno; cânfora; metil-éter-timol; terpin-4-ol; cariofileno; terc-butil-4-metoxifenol; 6 ácido 2-fenilacético; Z-cariofileno; $\beta$ -humuleno; Germacreno D; (E,E)- $\alpha$ -farneseno; $\gamma$ -cadieno; Triciclona; Limoneno; Terpinoleno; Linalol; E-Tagetone; Borneol; Verbenona; E-Carveol; $\beta$ -Elemeno; $\beta$ -Cariofileno; $\beta$ -Copaeno; $\alpha$ -E-bergamoteno; E-p-farneceno; Viridifloreno; Pogostol; Epi- $\beta$ -Bisabolol; Shyobunol; acetofenona; (2E,6E)-acetato de farnesil; trans-3-hexen-1-ol; 3 $\alpha$ -pineno; sabinene; 1-octen-3-ol; $\alpha$ -felandreno; $\delta$ -3-careno; (Z)- $\beta$ -ocimeno; (E)- $\beta$ -ocimeno; hidrato de cis-sabineno; óxido de (Z)-linalol; ipsdienol; umbelulona; terpinen-4-ol; carvacrol metilo; fenilacetato de etilo; acetato de carvacrol; acetato de geranilo; $\beta$ -gurjuneno; (Z)- $\beta$ -farneseno; (E)- $\beta$ -farneseno; alo-aromadendreno; $\beta$ -selineno; hidroxí butilado; anisole; $\gamma$ -cadineno; $\gamma$ -bisaboleno; germacreno B; germacreno D-4-ol; tilato de 2-feniletilo; 1-epi-cubenol; epi- $\alpha$ -cadinol; $\alpha$ -muurolol; $\alpha$ -cadinol; 6-Metil-heptan-2-ol; (Z)-Hidrato-sabineno; Acetato de Geranila; 2,5 dimetoxicetofenona; $\delta$ -Selineno; $\delta$ -Amorfeno.	PERERA et al., 2016; SOUSA et al., 2020; SOUZA et al., 2019; TOZIN; MARQUES; RODRIGUES, 2015)
	Folhas e inflorescências	(E)-2-hexenal; $\alpha$ -tujeno; $\alpha$ -pineno; 1-octen-3-ol; mirceno; $\alpha$ -terpineno; p-cimeno; 1,8-cineol; c-terpineno; linalol; ipsdienol; umbelulona; éter timol metílico; timol; carvacrol; acetato de carvacrol; (E)- $\beta$ -cariofileno; óxido de cariofileno.	(MAJOLO et al., 2017; SILVA et al., 2017b)
	Folhas secas	p-Cimeno; Carvacrol; $\gamma$ -Terpineno; Linalol.	(OLIVEIRA et al., 2021)



	Partes aéreas	$\alpha$ -terpineno; p-cimeno; 1,8-cineol; $\gamma$ -terpineno; $\beta$ -cariofileno; $\alpha$ -copaneno; éter metil timol; timol; terpinen-4-ol.	(MEDEIROS et al., 2016)
	Planta inteira	p-Cimeno; timol, éter metílico; trans-p-cariofileno; timol; carvacrol; acetato de timol; $\gamma$ -Terpineno; $\alpha$ -felandreno; 1,8-cineol; $\alpha$ -humuleno.	(CÁCERES et al., 2020)
<i>L. palmeri</i> S.Watson	Folhas	Timol; $\alpha$ -Cedreno; trans-piperitol; Eugenol; acetato de carvacrol; $\beta$ -Selineno; $\gamma$ -cadineno; Espatuleno.	(LEYVA-LÓPEZ et al., 2016)
<i>L. rigida</i> Schauer	Folhas	$\alpha$ -Pino; Limoneno; (E)- $\beta$ -Ocimeno; Linalol; Nerol; Ácido Nerólico; $\alpha$ -Cubebeno; Acetato de Geranila; $\alpha$ -Copaeno; $\beta$ -Cariofileno; $\beta$ -Copaeno; $\alpha$ -Humuleno; Aloaromadendreno; $\alpha$ -Amorfenol; Germacreno D; Bicyclogermacreno; $\gamma$ -Cadineno; A-Cadineno; (E)-Nerolidol; Espatuleno; Óxido de cariofileno; $\delta$ -Cadinol.	(OLIVEIRA et al., 2016)
<i>L. rotundifolia</i> Cham.	Folhas	Mirceno; Limoneno; Linalol; Mircenona; $\alpha$ -Terpineol; z-Ocimenona; Óxido de piperitenona; $\beta$ -Cariofileno; Óxido de cariofileno.	(HSIE et al., 2019)
	Partes aéreas	Hexanal; 2-hexenal; 3-hexen-1-ol; $\alpha$ -tujeno; $\alpha$ -pino; canfeno; sabinense; $\beta$ -pino; octen-3-ol; mirceno; $\alpha$ -felandren; o-cimeno; m-cimeno; limoneno; z-ocimeno; $\beta$ -ocimeno; $\gamma$ -terpineno; óxido de linalilo; terpinoleno; linalol; p-mentatrieno; cosmeno; tagetone; pinocarvona; borneol; butanoato-(Z)-3-hexenila; $\alpha$ -terpineol; butanoato-2-hexenilo; mirtenal; mirtenol; p-menta-1,8-dien-3-ona; tridecano; acetato de mirtenilo; $\delta$ -elemeno; $\alpha$ -cubebeno; 2-metil-tridecano; $\alpha$ -copaeno; $\beta$ -cubebeno; $\beta$ -elemeno; a-gurjuneno; $\alpha$ -cedreno; cariofileno; $\beta$ -cedreno; $\gamma$ -elemeno; $\alpha$ -bergamoteno.	(MEIRA; MARTINS; FONSECA, 2019)

<i>L. scaberrima</i> Sond.	Partes aéreas	$\alpha$ -pineno; canfeno; Sabineno; p-Cimeno; D-Limoneno; Cânfora; endo-Borneol; L- $\alpha$ -Terpineol; Carveol; (-)-Carvona; Isopiperitenona.	(REID; OOSTHUIZEN; LALL, 2020)
<i>L. schaueriana</i>	Folhas	p-Cimeno; Limoneno; cis- $\beta$ Ocimeno; Linalol; Menta-2,8-dien-1-ol (trans); Menta-2,8-dien-1-ol (cis); Mircenona; Trans-carveol; Carvona; Timol; Carvacrol; Trans-carvenil-acetato; Piperitona; Óxido de piperitona; $\beta$ -Cariofileno; Bicclogermacreno; $\beta$ -bisaboleno; Espatuleno; Óxido de cariofileno.	(SOUZA et al., 2018)
<i>L. sidoides</i> Cham.	Folhas	$\alpha$ -Felandreno; $\alpha$ -pineno; Mirceno; Cimeno; Limoneno; $\gamma$ -Terpineno; Cis-Hidrato Sabineno; 2-Metil-6-metileno-2,7-octadien-4-ol; $\alpha$ -Terpenol; Anisole; Timol; Copaene; iso-cariofileno; Aromadendrene; Humuleno; Lepidozeno; $\delta$ -Cadineno; 11-Biciclo[7,2,0]undecan-3-ol; Carvacrol; (E)-Cariofileno; Óxido de cariofileno; p-Cimeno; eucaliptol; Germacreno D; Linalol; Espatuleno; Terpinen-4-ol; $\alpha$ -Terpineol; Éter metil timol; Verbenona; Carbinol de vinil amil; Viridifloreno; Zonarene; $\alpha$ -tujeno; $\beta$ -pineno; terpineno-4-ol; a-copaeno; aromadendreno; $\alpha$ -humuleno; $\beta$ -bisaboleno; $\gamma$ -cadineno; espatulanol; acetato de timol; Carofileno; $\alpha$ -Carofileno; Óxido de Carofileno; Umbelulona; Ipsdienol; 1,8-Cineol; o-Cimeno; (+)-2-Careno; $\beta$ -Mirceno; D-Limoneno; $\delta$ -3-careno; (Z)- $\beta$ -ocimeno; (E)- $\beta$ -ocimeno; hidrato de trans-sabineno; terpinoleno; p-cimen-8-ol; aloaromadendreno; $\gamma$ -muuroleno; epi-cubedol; $\alpha$ -Terpineno; Éter metil carvacrol; $\beta$ -cariofileno; $\alpha$ -Fenchene; Verbena; p-Ment-2,4(8)-diene; Cânfora; Isoborneol; acetato de Bornilo; $\beta$ -elemeno; $\alpha$ -	(BACCI et al., 2015; BRITO et al., 2015; FIGUEIREDO et al., 2017; GARMUS et al., 2015; MIURA et al., 2021; MORAIS et al., 2016; MOTA; DANTAS; FROTA, 2018; NONATO et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2019b, 2019c; SANTANA et al., 2021; SANTOS et al., 2015; SARAIVA et al., 2020,

		Cedrene; cis-tujopseno; $\alpha$ -Guaiene; $\alpha$ -Himachaleno; ar-Curcumeno; $\beta$ -Selineno; 6,7-Epoximirceno; p-Cymen-8-ol; $\alpha$ -Ylangene; Silestreno; trans- $\alpha$ -bergamoteno; cis-prenil-limoneno; $\delta$ -Selineno.	2021; ZILLO et al., 2018)
	Folhas e caules	$\alpha$ -Tujeno; $\alpha$ -pineno; $\beta$ -Mirceno; $\alpha$ -Terpineno; p-Cimeno; Limoneno; 1,8-Cineol; $\gamma$ -Terpineno; 3,3,6-Trimetil-1,5-heptadien-4-ol; Terpinen-4-ol; éter timol metílico; Timol; $\alpha$ -Copaeno; $\beta$ -Cariofileno; Aromadendrene; $\alpha$ -Cariofileno; $\delta$ -Cadineno; Espulenol; Óxido de cariofileno.	(VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2018)
	Folhas e inflorescências	$\alpha$ -tujeno; $\alpha$ -pineno; mirceno; $\alpha$ -terpineno; p-cimeno; limoneno; 1,8-cineol; $\gamma$ -terpineno; ipsdienol; umbelulona; terpinen-4-ol; $\alpha$ -terpineno; éter timol metílico; timol; $\alpha$ -copaeno; $\beta$ -cariofileno; aromadendreno; ledeno; $\alpha$ -humuleno; $\delta$ -cadineno; óxido de cariofileno.	(MAJOLO et al., 2017; MONTEIRO et al., 2021b)
	Folhas secas	$\alpha$ -Tujeno; Mirceno; $\alpha$ -Terpineno; p-Cimeno; $\gamma$ -Terpineno; Metiltimol; Timol; Carvacrol; $\beta$ -Cariofileno.	(PENHA et al., 2021; VERAS et al., 2017)
<i>L. thymoides</i> Mart. & Schauer	Flores	$\alpha$ -tujeno; $\alpha$ -pineno; canfeno; Sabineno; $\beta$ -pineno; Mirceno; $\alpha$ -felandreno; $\alpha$ -terpineno; p-cimeno; Limoneno; 1,8-cineol; (E)- $\beta$ -ocimeno; $\gamma$ -terpineno; hidrato de cis-sabineno; Terpinoleno; para-cimeno; Linalol; hidrato de trans-sabineno; Cânfora; 3-metil-3-butenil-3-metilbutanoato; Borneol; Umbelulona; terpinen-4-ol; $\alpha$ -terpineol; éter metil timol; Timol; acetato de timol; $\alpha$ -copaeno; $\beta$ -cariofileno; trans- $\alpha$ -bergamoteno; $\gamma$ -elemeno; $\alpha$ -humuleno; $\gamma$ -muuroleno; germacreno D; $\gamma$ -amorfenol; $\alpha$ -muuroleno; $\gamma$ -cadineno; $\delta$ -cadineno; óxido de cariofileno; epóxido de	(SILVA et al., 2019b)

		humuleno II; epi- $\alpha$ cadinol; $\alpha$ -cadinol; 14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno; $\gamma$ -amorfenol; $\alpha$ -muuroleno.	
	Folhas	$\alpha$ -pineno; canfeno; $\beta$ -pineno; $\beta$ -mirceno; 3-careno; o-cimeno; Eucaliptol; L-pinocarveol; Cânfora; isopulegol; citronelal; Pinocarvona; Borneol; $\alpha$ -terpineol; p-cimen-8-ol; Verbenona; Carveol; Carvona; acetato de Bornilo; p-cimen-2-ol; Copaene; Cariofileno; $\alpha$ -curcumenol; $\alpha$ -selineno; $\beta$ -cadineno; $\delta$ -cadineno; Germacreno B; Óxido de cariofileno; $\gamma$ -eudesmol; $\delta$ -cadinol; $\alpha$ -tujeno; Sabineno; $\alpha$ -felandreno; $\alpha$ -terpineno; p-cimeno; Limoneno; 1,8-cineol; (E)- $\beta$ -ocimeno; $\gamma$ -terpineno; Terpinoleno; p-cimeno; Linalol; 3-metil-3-butenil-3-metilbutanoato; Umbelulona; terpinen-4-ol; éter metil timol; Timol; acetato de timol; Eugenol; $\alpha$ -copaeno; $\beta$ -cariofileno; trans- $\alpha$ -bergamoteno; Aromadendreno; $\alpha$ -humuleno; $\gamma$ -muuroleno; germacreno-D- $\gamma$ -amorfenol; $\alpha$ -muuroleno; $\delta$ -amorfenol; $\gamma$ -cadineno; trans-calameneno; trans-cadina-1,4-dieno; $\alpha$ -cadineno; epóxido de humuleno II; epi- $\alpha$ -cadinol; $\alpha$ -cadinol; 14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno; hidrato de trans-sabineno; timoquinona; $\beta$ -copano; $\gamma$ -elemeno; alo-aromadendreno; $\gamma$ -amorfenol; hidroxianisol butilado; $\alpha$ -amorfenol; trans-calameno; abacateirofurano; ciclopentadecanolida; neofitadieno; Z,Z-farnesilacetona; fitol; p-cimeno-8-ol; Bornilacetato; p-cimeno-2-ol; E-p-ocimeno; hidrato de cis-sabineno; $\beta$ -bourboneno; epi- $\alpha$ -muurolol; $\alpha$ -Terpinenol; $\delta$ -Elemeno; $\alpha$ -Cubebeno; $\beta$ -Cubebeno; $\beta$ -	(BRITO et al., 2021; MOTA et al., 2022; NASCIMENTO et al., 2021; SILVA et al., 2016, 2019b, 2021)

		Elemeno; $\alpha$ -Gurjuneno; $\alpha$ -Cedreno; Cupareno; $\beta$ -bisaboleno; Z- $\alpha$ -bisaboleno; Calameneno; trans-Nerolidol; Espatuleno.	
	Folhas e ramos	(3Z)-hexenol; $\alpha$ -Tujeno; Sabineno; 1-octen-3-ol; Mirceno; $\alpha$ -felandreno; $\alpha$ -Terpineno; p-Cimeno; Limoneno; 1,8-Cineol; (E)- $\beta$ -Ocimeno; $\gamma$ -Terpineno; hidrato de cis-Sabineno; Terpinoleno; Linalol; Cânfora; Borneol; Umbelulona; Terpinen-4-ol; $\alpha$ -Terpineol; éter timol metílico; Timol; acetato de timol; Eugenol; $\alpha$ -Copaeno; Metileugenol; (E)-cariofileno; trans- $\alpha$ -bergamoteno; Aromadendrene; 6,9-Guiaadieno; $\alpha$ -Humuleno; $\gamma$ -Muuroleone; Germacreno D; $\gamma$ -amorfenol; Viridiforeno; $\alpha$ -Muuroleone; $\delta$ -amorfenol; $\gamma$ -Cadineno; $\delta$ -Cadineno; trans-Calameneno; $\alpha$ -Cadineno; Óxido de cariofileno; epóxido de humuleno II; $\alpha$ -Cadinol; 14-Hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno.	(SILVA et al., 2018)
	Raízes	$\alpha$ -tujeno; canfeno; Sabineno; $\beta$ -pineno; Mirceno; $\alpha$ -felandreno; $\alpha$ -terpineno; p-cimeno; Limoneno; 1,8-cineol; (E)- $\beta$ -ocimeno; $\gamma$ -terpineno; Terpinoleno; Linalol; Cânfora; Umbelulona; terpinen-4-ol; $\alpha$ -terpineol; éter metil timol; Timol; acetato de timol; Eugenol; $\alpha$ -copaeno; acetato de carvacrol; $\beta$ -bourboneno; Metileugenol; $\beta$ -cariofileno; trans- $\alpha$ -bergamoteno; Aromadendrene; $\alpha$ -humuleno; $\gamma$ -muuroleone; germacreno-D; $\gamma$ -amorfenol; $\alpha$ -selineno; $\alpha$ -muuroleone; $\alpha$ -amorfenol; $\gamma$ -cadineno; $\delta$ -cadineno; trans-calameneno; trans-cadina-1,4-dieno; $\alpha$ -cadineno; germacreno B; Espatuleno; óxido de cariofileno; epóxido de humuleno II; epi- $\alpha$ -cadinol; epi- $\alpha$ -muurolol; $\alpha$ -muurolol; $\alpha$ -cadinol; ácido	(SILVA et al., 2019b)

		tetradecanóico; 14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno; ácido hexadecanóico; ácido (9Z)-octadecenóico.	
--	--	--	--

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. C. et al. Atividade antisséptica do óleo essencial de *Lippia origanoides* Cham. (Alecrim-pimenta) na presença de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 905–911, 2016. DOI: 10.1590/S0100-736X2016000900018.
- ALMEIDA, B. R. et al. Macronutrient omission changes *Lippia gracilis* Schauer, a threatened medicinal plant, growth and volatile chemical composition. **HortScience**, v. 53, n. 12, p. 1877–1882, 2018. DOI: 10.21273/HORTSCI13492-18.
- ALVES, M. S. et al. Essential Oils Composition and Toxicity Tested by Fumigation Against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) Pest of Stored Cowpea. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2387–2399, 2015. DOI: 10.5935/1984-6835.20150142.
- BACCI, L. et al. Toxicity, behavior impairment, and repellence of essential oils from pepper-rosmarin and patchouli to termites. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 156, n. 1, p. 66–76, 2015. DOI: 10.1111/eea.12317.
- BARBIERI, N. et al. Effect of cyclodextrins and Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) chemotypes on the microencapsulation of essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 121, p. 114–123, 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.04.081.
- BARRIGA, I. B. et al. Essential oil of *Lippia grata* (Verbenaceae) is effective in the control of monogenean infections in *Colossoma macropomum* gills, a large Serrasalimidae fish from Amazon. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 9, p. 3804–3812, 2020. DOI: 10.1111/are.14728.
- BATISTA, A. et al. Modulatory effect of *Lippia alba* essential oil on the activity of clinically used antimicrobial agents on *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae* biofilm. **Scientia Pharmaceutica**, v. 86, n. 4, p. 52, 2018. DOI: 10.3390/scipharm86040052.
- BITU, V. C. N. et al. Effect of Collection Time on Composition of Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) Growing in Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 18, n. 3, p. 647–653, 2015. DOI: 10.1080/0972060X.2014.935043.
- BRITO, G. A. et al. Identification of Bioactive Compounds against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by Bioassays and *in silico* Assays. **Chemistry and Biodiversity**, v. 18, p. e2100242, 2021. DOI: 10.1002/cbdv.202100242.
- BRITO, D. I. V. et al. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 836–844, 2015. DOI: 10.1590/1983-084X/14\_060.

BUGAYONG, A. M.; CRUZ, P.; PADILLA, P. I. Antibacterial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Leaves of Some Aromatic Plants of Philippines. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 22, n. 4, p. 932–946, 2019. DOI: 10.1080/0972060X.2019.1682683.

CÁCERES, M. et al. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. **Antibiotics**, v. 9, p. 147, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9040147.

CASTILHO, C. V. V. et al. *In vitro* propagation of a carvacrol-producing type of *Lippia origanoides* Kunth: A promising oregano-like herb. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 491–498, 2019. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.01.006.

DIAS, C. N. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from Brazilian legal Amazon plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 490765, 2015. DOI: 10.1155/2015/490765.

ENDRIS, A.; ASFAW, N.; BISLAT, D. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Lippia javanica* leaves from Ethiopia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 28, n. 3, p. 221–226, 2015. DOI: 10.1080/10412905.2015.1108880.

ETIENNE, T. V.; MOHAMED, C.; CHRISTIANE, A. S. A. Antifungal potential of *Lippia multiflora* Mold. and *Melaleuca leucadendron* L. essential oils against some root borne fungi of *Ipomea batatas* (L.) Lam. in Côte d'Ivoire. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 8, n. 5, p. 654–662, 2020. DOI: 10.18006/2020.8(5).654.662.

FELIX, S. F. et al. Chemical composition, larvicidal activity, and enzyme inhibition of the essential oil of *Lippia grata* Schauer from the caatinga biome against dengue vectors. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 3, p. 250, 2021. DOI: 10.3390/ph14030250.

FIGUEIREDO, M. B. et al. Lethal and sublethal effects of essential oil of *Lippia sidoides* (verbenaceae) and monoterpenes on Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 1, p. 63–69, 2017. DOI: 10.1590/0074-02760160388.

FIKADU, Y.; YAYA, E. E.; CHANDRAVANSI, B. S. Chemical composition and antioxidant activities of the essential oils of *Lippia adoensis* Hochst ex. Walp and *Ocimum sanctum* Linn. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 36, n. 1, p. 95–108, 2022. DOI: 10.4314/bcse.v36i1.9.

FONTANA, D. C. et al. Using essential oils to control diseases in strawberries and peaches. **International Journal of Food Microbiology**, v. 338, p. 108980, 2021. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108980.



- GALVÃO, J. G. et al. *Lippia gracilis* essential oil in  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: an environmentally safe formulation to control *Aedes aegypti* larvae. **Pest Management Science**, v. 75, p. 452–459, 2019. DOI: 10.1002/ps.5138.
- GARMUS, T. T. et al. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 68–75, 2015. DOI: 10.1016/j.supflu.2015.01.016.
- GIMENES, L. et al. Essential oils of new *Lippia alba* genotypes analyzed by flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography (Gc $\times$ gc) and chemometric analysis. **Molecules**, v. 26, n. 8, p. 2332, 2021. DOI: 10.3390/molecules26082332.
- GODOY, J. A. et al. Effect of essential oils of *Cymbopogon citratus* (Dc.) Stapf (lemon grass) and *Lippia alba* (Mill.) N. E. br. ex Britton & p. Wilson (bushy matgrass) on *Xanthomonas axonopodis* and *Ralstonia* sp. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 25, n. 4, p. e1085, 2020.
- GOMES, D. S. et al. *Lippia alba* and *Lippia gracilis* essential oils affect the viability and oviposition of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 231, p. 106434, 2022. DOI: 10.1016/j.actatropica.2022.106434.
- GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E. et al. Pharmacological evaluation of the anxiolytic-like effects of *Lippia graveolens* and bioactive compounds. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1569–1576, 2017. DOI: 10.1080/13880209.2017.1310908.
- GUEVARA, P. et al. Biocidal effect of a hexane-soluble extract of *Lippia graveolens* Kunth (Verbenaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 17, n. 4, p. 342–349, 2018.
- HERNANDES, C. et al. *Lippia origanoides* essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 900–910, 2017. DOI: 10.1111/jam.13398.
- HSIE, B. S. et al. Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 198, p. 111577, 2019. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111577.
- JOSÉ-RITA, B. J. et al. Study of the chemical and *in vitro* cytotoxic activities of essential oils (EOs) of two plants from the Ivorian flora (*Lippia multiflora*, *Zingiber officinale*) and their antiviral activities against non-enveloped viruses. **South African Journal of Botany**, v. 000, p. 1–7, 2022. DOI: 10.1016/j.sajb.2022.03.053.

KAMANULA, J. F. et al. Chemical variation and insecticidal activity of *Lippia javanica* (Burm. f.) Spreng essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Industrial Crops and Products**, v. 110, p. 75–82, 2017. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.06.036.

KAMPKE, E. H. et al. Genotoxic effect of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown essential oil on fish (*Oreochromis niloticus*) and mammal (*Mus musculus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 59, p. 163–171, 2018. DOI: 10.1016/j.etap.2018.03.016.

KOBENAN, K. C. et al. Chemical Composition, Antioxidant Activity, Cholinesterase Inhibitor and *in vitro* Insecticidal Potentiality of Essential Oils of *Lippia multiflora* Moldenke and *Eucalyptus globulus* Labill. on the Main Carpophagous Pests of Cotton Plant in Ivory Coast. **Chemistry and Biodiversity**, v. 19, n. 4, p. e202100993, 2022. DOI: 10.1002/cbdv.202100993.

LAZZARINI, L. E. S. et al. Growth regulators affect the dry weight production, carvacrol and thymol content of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 35–44, 2019. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.11.070.

LEAL, L. E. et al. Effects of essential oils from two *Lippia species* on growth of phytopathogenic fungi. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 17, n. 1, p. 30–35, 2018.

LEYVA-LÓPEZ, N. et al. Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 187, p. 302–312, 2016. DOI: 10.1016/j.jep.2016.04.051.

LIMA, A. S. et al. Assessment of the repellent effect of *Lippia alba* essential oil and major monoterpenes on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, p. 73–77, 2016. DOI: 10.1111/mve.12140.

LISBOA, C. F. et al. Chemical composition of *Lippia origanoides* Kunt. and *Ocimum gratissimum* L. essential oils stored at –20 °C. **Industrial Crops and Products**, v. 151, p. 112485, 2020. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112485.

MAJOLO, C. et al. Chemical composition of *Lippia spp.* essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 48, p. 2380–2387, 2017. DOI: 10.1111/are.13073.

MAR, J. M. et al. *Lippia origanoides* essential oil: An efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 292–297, 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.10.033.

- MARCIAL, G. et al. Intraspecific variation in essential oil composition of the medicinal plant *Lippia integrifolia* (Verbenaceae). Evidence for five chemotypes. **Phytochemistry**, v. 122, p. 203–212, 2016. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.11.004.
- MEDEIROS, F. C. M. et al. Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 114, p. 87–93, 2016. DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.06.003.
- MEDINA-ROMERO, Y. M. et al. Essential oils of *Bursera morelensis* and *Lippia graveolens* for the development of a new biopesticides in postharvest control. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-99773-0.
- MEIRA, M. R.; MARTINS, E. R.; FONSECA, F. S. A. Chemical diversity of the volatiles of *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) in Minas Gerais, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 1, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1590/0001-3765201920180498.
- MELO, J. O. et al. Content and chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer accessions in different drying times. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 6, p. 1821–1828, 2019.
- MIURA, P. T. et al. Study of the chemical composition and ecotoxicological evaluation of essential oils in *Daphnia magna* with potential use in aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 7, p. 3415–3424, 2021. DOI: 10.1111/are.15186.
- MONTEIRO, I. N. et al. Toxicity of the *Lippia gracilis* essential oil chemotype, pinene-cineole-limonene, on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 41, n. 1, p. 181–187, 2021a. DOI: 10.1007/s42690-020-00191-y.
- MONTEIRO, P. C. et al. Antimicrobial activity of essential oils from *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* against *Aeromonas* spp. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, n. 2, p. 152–161, 2021b. DOI: 10.1080/10412905.2020.1848653.
- MORAIS, S. R. et al. Essential oil composition, antimicrobial and pharmacological activities of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) from São Gonçalo do Abaeté, Minas Gerais, Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, p. 262–270, 2016. DOI: 10.4103/0973-1296.192197.
- MOTA, A. P. P.; DANTAS, J. C. P.; FROTA, C. C. Antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citrates*, *Plectranthus amboinicus*, and *Cinnamomum zeylanicum* against *Mycobacterium tuberculosis*. **Ciencia Rural**, v. 48, n. 6, p. e20170697, 2018. DOI: 10.1590/0103-8478cr20170697.
- MOTA, T. F. et al. Screening organic repellent compounds against *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:

Psychodidae) present in plant essential oils: Bioassay plus an *in silico* approach. **Acta Tropica**, v. 229, p. 106367, 2022. DOI: 10.1016/j.actatropica.2022.106367.

MUÑOZ-ACEVEDO, A. et al. New chemovariety of *Lippia alba* from Colombia: Compositional analysis of the volatile secondary metabolites and some *in vitro* biological activities of the essential oil from plant leaves. **Natural Product Communications**, p. 1–7, 2019. DOI: 10.1177/1934578X19862905.

NASCIMENTO, L. D. et al. Drying effects on chemical composition and antioxidant activity of *Lippia thymoides* essential oil, a natural source of thymol. **Molecules**, v. 26, p. 2621, 2021. DOI: 10.3390/molecules26092621.

NONATO, C. F. A. et al. Comparative analysis of chemical profiles and antioxidant activities of essential oils obtained from species of *Lippia* L. by chemometrics. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132614, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132614.

NUNES, A. R. et al. Photoprotective potential of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 189, n. July, p. 119–123, 2018. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.10.013.

OLIVEIRA, A. S. et al. Investigation of Antioxidant Activity, Acute Toxicity and Anticholinesterasic Potential of *Lippia hirta* (Verbenaceae). **Revista Virtual de Quimica**, v. 11, n. 2, p. 432–448, 2019a. DOI: 10.21577/1984-6835.20190033.

OLIVEIRA, F. C. et al. Chemical composition and biological activities of the essential oil from leaves of *Lippia rigida*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 52, n. 6, p. 1121–1122, 2016. DOI: 10.1007/s10600-016-1881-3.

OLIVEIRA, J. et al. Antifungal activity of essential oils associated with carboxymethylcellulose against *Colletotrichum acutatum* in strawberries. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 261–267, 2019b. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.08.032.

OLIVEIRA, J. et al. Control of *Rhizopus stolonifer* in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethylcellulose. **International Journal of Food Microbiology**, v. 292, p. 150–158, 2019c. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.014.

OLIVEIRA, M. I. B. et al. *In vitro* anthelmintic efficacy of essential oils in the control of *Neoechinorhynchus buttnerae*, an endoparasite of *Colossoma macropomum*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, n. 5, p. 509–522, 2021. DOI: 10.1080/10412905.2021.1921065.

OLIVEIRA, T. N. S. et al. Antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of leaves from *Lippia*

*gracilis* Schauer against phytopathogenic fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 4, p. 1117–1129, 2020. DOI: 10.1111/jam.14857.

PENHA, T. et al. Effects of acaricidal essential oils from *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their main components on vitellogenesis in *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 299, p. 109584, 2021. DOI: 10.1016/j.vetpar.2021.109584.

PERERA, W. H. et al. Essential oil constituents from high altitude Brazilian species with antimicrobial activity: *Baccharis parvidentata* Malag., *Hyptis monticola* Mart. ex Benth. and *Lippia origanoides* Kunth. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 2, p. 109–116, 2016. DOI: 10.1080/10412905.2016.1210039.

POSSAMAI, M. C. F. et al. *In vitro* bacteriostatic activity of *Origanum vulgare*, *Cymbopogon citratus*, and *Lippia alba* essential oils in cat food bacterial isolates. **Semina**, v. 40, n. 6, p. 3107–3122, 2019. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl2p3107.

REID, A.; OOSTHUIZEN, C. B.; LALL, N. *In vitro* antimycobacterial and adjuvant properties of two traditional South African teas, *Aspalathus linearis* (Burm.f.) R. Dahlgren and *Lippia scaberrima* Sond. **South African Journal of Botany**, v. 128, p. 257–263, 2020. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.11.007.

SAMBA, N. et al. Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Lippia multiflora* Moldenke Essential Oil from Different Regions of Angola. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 155, 2020. DOI: 10.3390/molecules26010155.

SANTANA, M. F. et al. Bioactivity of essential oils for the management of *Tetranychus urticae* Koch and selectivity on its natural enemy *Neoseiulus californicus* (McGregor): A promising combination for agroecological systems. **Acarologia**, v. 61, n. 3, p. 564–576, 2021. DOI: 10.24349/acarologia/20214451.

SANTOS, C. P. et al. Chemical diversity and influence of plant age on the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. germplasm. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 416–421, 2015. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.07.017.

SANTOS, C. P. et al. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 205–210, 2016. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.11.015.

SANTOS, M. C. et al. Bioactivity of essential oil from *Lippia gracilis* Schauer against two major coconut pest mites and toxicity to a non-target predator. **Crop Protection**, v. 125, p. 104913, 2019. DOI: 10.1016/j.cropro.2019.104913.

SARAIVA, A. G. Q. et al. Chemical analysis and vibrational spectroscopy study of essential oils from *Lippia sidoides* and of its major constituent. **Vibrational Spectroscopy**, v. 110, p. 103111, 2020. DOI: 10.1016/j.vibspec.2020.103111.

SARAIVA, W. V. A. et al. Toxic effects of an essential oils mixture on *Aleurodicus cocois* (Hemiptera: Aleyrodidae) and *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 31, n. 5, p. 526–540, 2021. DOI: 10.1080/09583157.2020.1871468.

SILVA, A. C. C. et al. HS-SPME as an efficient tool for discriminating chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 42–46, 2017. DOI: 10.21577/0100-4042.20160156.

SILVA, A. M. S. et al. Prospecting of essential oils in combination with florfenicol against motile *Aeromonas* isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 7, p. 392, 2022. DOI: 10.1007/s00203-022-03015-4.

SILVA, A. P. et al. Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) essential oils. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–17, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0175598.

SILVA, F. S. et al. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 25–34, 2016. DOI: 10.3109/13880209.2015.1005751.

SILVA, R. S. et al. Antimicrobial activity of *Lippia gracilis* essential oils on the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their effect on membrane integrity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 160, p. 40–48, 2019a. DOI: 10.1016/j.pestbp.2019.06.014.

SILVA, S. G. et al. Chemical profile of *Lippia thymoides*, evaluation of the acetylcholinesterase inhibitory activity of its essential oil, and molecular docking and molecular dynamics simulations. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1–17, 2019b. DOI: 10.1371/journal.pone.0213393.

SILVA, S. G. et al. Planting and seasonal and circadian evaluation of a thymol-type oil from *Lippia thymoides* Mart. & Schauer. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1186/s13065-018-0484-4.

SILVA, S. G. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction to obtain *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae) essential oil rich in thymol and evaluation of its antimicrobial activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 168, p. 105064, 2021. DOI: 10.1016/j.supflu.2020.105064.

SORO, L. C. et al. Influence of geography, seasons and pedology on chemical composition and anti-inflammatory activities of essential oils from *Lippia multiflora* Mold leaves. **Journal of**

**Ethnopharmacology**, v. 194, p. 587–594, 2016. DOI: 10.1016/j.jep.2016.10.047.

SORO, L. C. et al. Chemical composition of leaf essential oils of *Lippia multiflora* mold. grown in savannah and forest area in the Ivory Coast. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 18, n. 1, p. 154–160, 2015. DOI: 10.1080/0972060X.2014.977571.

SOUSA, M. A. A. et al. Chemical composition and phytotoxic activity of *Lippia organoides* essential oil on weeds. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14, n. 3, p. 3015–3024, 2020. DOI: 10.21475/ajcs.20.14.03.p2595.

SOUZA, C. F. et al. Physiological responses of *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) to anesthesia with essential oils from two different chemotypes of *Lippia alba*. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2017a. DOI: 10.1590/1982-0224-20160083.

SOUZA, L. I. O. et al. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1055–1064, 2017b. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.11.121.

SOUZA, L. M. et al. Essential oil composition in natural population of *Lippia organoides* (Verbenaceae) during dry and rainy seasons. **Revista de Biologia Tropical**, v. 67, n. 1, p. 278–285, 2019. DOI: 10.15517/RBT.V67I1.31407.

SOUZA, A. V. V. et al. Chemical Composition of Essential Oil of Leaves from *Lippia schaueriana* Mart. Collected in the Caatinga Area. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2480, 2018. DOI: 10.3390/molecules23102480.

SOUZA, A. V. V. et al. Essential Oil Content and Chemical Composition of *Lippia gracilis* Schauer Cultivated in the Sub-meddle São Francisco Valley. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 20, n. 4, p. 983–994, 2017c. DOI: 10.1080/0972060X.2017.1377117.

TEODORO, A. V. et al. Toxicity and repellency of the essential oil from *Lippia gracilis* to the coconut mite *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae). **International Journal of Acarology**, v. 47, n. 5, p. 414–417, 2021. DOI: 10.1080/01647954.2021.1922497.

TONI, C. et al. Sedative effect of 2-phenoxyethanol and essential oil of *Lippia alba* on stress response in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Research in Veterinary Science**, v. 103, p. 20–27, 2015. DOI: 10.1016/j.rvsc.2015.09.006.

TOZIN, L. R. S.; MARQUES, M. O. M.; RODRIGUES, T. M. Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia organoides* kunth (Verbenaceae) in the brazilian cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 87, n. 2, p. 943–953, 2015. DOI: 10.1590/0001-

3765201520140376.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D. et al. Control of *Staphylococcus aureus* biofilms by the application of single and combined treatments based in plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 286, p. 128–138, 2018. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.007.

VERAS, H. N. H. et al. Enhancement of aminoglycosides and  $\beta$ -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2790–S2795, 2017. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.10.030.

XAVIER, A. L. et al. Chemical composition, antitumor activity, and toxicity of essential oil from the leaves of *Lippia microphylla*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 70, n. 5–6, p. 129–137, 2015. DOI: 10.1515/znc-2014-4138.

ZILLO, R. R. et al. Carboxymethylcellulose coating associated with essential oil can increase papaya shelf life. **Scientia Horticulturae**, v. 239, p. 70–77, 2018. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.05.025.



**Apêndice 2.** Composição não-volátil do gênero *Lippia* L.

<b>Espécie</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Compostos identificados</b>	<b>Compostos isolados</b>	<b>Autor</b>
<i>L. alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson	Folhas	Theveside; 8-epi-Loganina; ácido genoposídico; mussaenosídeo; Cistanosídeo; diastereoisómero b-OH-acteosido; Apigenina-7-O-diglucuronido; Crisoeriol-7-O-diglucuronido; Tricina-7-O-diglucuronido; Forsitósido B; Calceolarioside E/isonuomiside; Acteosido; Luteolina-7-O-glucuronido; isoacteoside; Tricina-7-O-glucuronido; Leucosceptósido A; Martinoside	-	(TIMÓTEO et al., 2015)
	Folhas secas	Ácido elágico; ácido protocatecuico; isorhamnetina; ácido salicílico; ácido clorogênico; luteolina; apigenina.	-	(OLIVEIRA et al., 2018)
<i>L. graveolens</i> Kunth	Folhas	Quercetina-O-hexósido; Scutellareina-7-O-hexosido; Floridzina; derivado de tri-hidroxi-metoxiflavona; 6-O-Metilescutelareína.	-	(LEYVA-LÓPEZ et al., 2016)
	Folhas	-	Naringenina; Cirsimaritina.	(GONZÁLEZ-TRUJANO et al., 2017)
	Partes aéreas	Metil 4,6-O-di-O-galoil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo/Metil 6-O-digalloil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo I/II; Tulipósido F/Caquinósido IV; 5,7,8-tri-hidroxycumarina-5- $\beta$ -	-	(CORTÉS-CHITALA et al., 2021)

glucopiranosídeo; 1-O-(4-Hidroxibenzoil)- $\beta$ -D-glicose; (2R)- e (2S)-3',4',5,6-tetrahidroxiflavanona 7-O- $\beta$ -glicopiranosídeo/(2R)- e (2S)-3',4',5,8-tetrahidroxiflavanona 7- O- $\beta$ -glucopiranosídeo; ácido deacetil asperulosídico/Teveside/ Monotropeína; Apigenina-6,8-di-C-glucósido/Kaempferol-3-O-rutinosídeo; (1R,2R)-5'-hidroxijasmônico ácido 5'-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo/ácido glicosídeo tuberônico; (2R)- e (2S)-3',4',5,6-tetrahidroxiflavanona 7-O- $\beta$ -glicopiranosídeo/(2R)- e (2S)-3',4',5,8-tetrahidroxiflavanona 7- O- $\beta$ -glucopiranosídeo; 6-Hidroxluteolin-7-O-hexosídeo; (2R)- e (2S)-3',4',5,6-tetrahidroxiflavanona 7-O- $\beta$ -glicopiranosídeo/(2R)- e (2S)-3',4',5,8-tetrahidroxiflavanona 7- O- $\beta$ -glucopiranosídeo; Verbascoside/ Isoverbascoside/ Forsitoside A; 3-Hidroxifloretina 6'-O-hexosídeo; Taxifolina; Cosmoside; Florizina; 4-metoxifenil 1-O- $\beta$ -D-[5-O-(3,4-dimetoxibenzoil)]-apio-furanosil-(1-6)- $\beta$ -D-glucopiranosídeo; Eriodictiol; 2''-O-(3''',4'''-dimetoxibenzoil)orientina; Ikarisosside F; 6''-O-

		p-hidroxibenzoiliridina; Quercetina; ácido sinápico C-hexósido; Floretina; Naringenina; Hispidulina; Taxóide diterpênico; Cirsimaritina; Pinocebrina; Galangina; Genkwanin; ácido (R)-hidroxi-octadeca-(9Z,11E,15Z)-trien-óico/Higrosforona F; ácido (S)-cariólico/ácido coronário; Lancilactona B; ácido camarico; Salviol; Grandidona D; Lespedezol; Lantadeno; Lancilactona B; Antron.		
	Planta inteira seca	Eriodictiol; Luteolina; Naringenina; Hesperetina; Apigenina; Crisoeriol; Pinocebrina; Cirsimaritina; Sakuranetina; Galangina.	-	(ARIAS et al., 2020)
<i>L. hirta</i> (Cham.) Meisn. ex Walp.	Partes aéreas	-	Dihidrocorinanteol; vincamina; deoxicordifolina.	(OLIVEIRA et al., 2019)
<i>L. integrifolia</i> (Griseb.) Hieron.	Folhas	6-hidroxluteolina-hexósido; 6-metoxiluteolin-O-hexósido; floretina-3'.5'-di-C-hexósido; acteosido; 6-metoxiscutelareína-hexósido; dimetil-secologanósido; ácido ferúlico di-hexose; anel B - flavona-hexosídeo I dimetoxilado; anel B - flavona-hexósido II dimetoxilado; apigenina-hexósido metoxilado; (Epi) lippidulcina A; alo-davanona; peroxilipidulcina; salvigenina.	-	(MERCADO et al., 2020)

<i>L. origonoides</i> Kunth	Folhas	-	Sakuranetina.	(NUNES et al., 2018)
	Partes aéreas	Luteolina-6,8-diC-hexoside; Apigenina-6,8-diC-glucoside; Taxifolina; Orientina; Isoorientina; Robinetina-7' (or 4')- O-hexose; Vitexina; Verbascoside; Isovitexina; Luteolina-7-O-glucoside; Robinetina-3-O-hexose; Quercetina-4' -O-glucoside; Eriodictyol; Naringenina; Ramnocitrina 3',4'-dimetoxifisetina; Pinocebrina; Carvacrol; Timol.	-	(LEITÃO et al., 2017)
	Planta inteira seca	Taxifolina; Eriodictiol; Quercetina; Luteolina; Naringenina; Hesperetina; Apigenina; Crisoeriol; Flavona dimetilada; Pinocebrina; Cirsimaritina; Sakuranetina; Galangina; Galangina metilada; Apigenina metilada.	-	(ARIAS et al., 2020)
<i>L. palmeri</i> S.Watson	Folhas	Quercetina-O-hexósido; Luteolina-7-O-glucuronido-3'-O-glucósido; 7-O-hexósido de escutelareína; derivado de tri-hidroxi-metoxiflavona; 6-O-Metilescutelareína.	-	(LEYVA-LÓPEZ et al., 2016)
<i>L. rubella</i> (Moldenke) T.R.S.Silva & Salimena	Partes aéreas	-	Lippiarubelósido A; Lippiarubelósido B; Forsitósido A; Verbascoside; Isoverbascosido; Poliumósido;	(MARTINS et al., 2019)

			Pectolinarina; Linarina; Siparunosídeo.	
<i>L. rugosa</i> A.Chev.	Folhas	-	Flavolipia; 2,4-dimetilpiridin-3,5-diol; 5-hidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona; 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona; 7-hidroxi-5,6,4'-trimetoxiflavona; a-amirina; acetato de lupeol; Lupeol; Betulina; Fridelano; Sacarose; Cosanol.	(NONO et al., 2022)
<i>L. sidoides</i> Cham.	Folhas	Ácido gálico; Catequina; Galato de epigalocatequina; Epicatequina; Ácido cafeico; Ácido vanílico; p -ácido cumárico; Ácido ferúlico; Ácido salicílico; Quercetina.	-	(BRAGA et al., 2019)

## REFERÊNCIAS

- ARIAS, J. et al. Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia organoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO<sub>2</sub> after steam distillation. **Industrial Crops and Products**, v. 146, p. 112170, 2020. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112170.
- BRAGA, M. A. et al. Prospection of Enzyme Modulators in Aqueous and Ethanolic Extracts of *Lippia sidoides* Leaves: Genotoxicity, Digestion, Inflammation, and Hemostasis. **Chemistry and Biodiversity**, v. 16, n. 3, p. e1800558, 2019. DOI: 10.1002/cbdv.201800558.
- CORTÉS-CHITALA, M. C. et al. Identification and Quantification of Phenolic Compounds from Mexican Oregano (*Lippia graveolens* HBK) Hydroethanolic Extracts and Evaluation of Its Antioxidant Capacity. **Molecules**, v. 26, p. 702, 2021. DOI: 10.3390/molecules26030702.
- GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E. et al. Pharmacological evaluation of the anxiolytic-like effects of *Lippia graveolens* and bioactive compounds. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1569–1576, 2017. DOI: 10.1080/13880209.2017.1310908.
- LEITÃO, S. et al. Counter-current chromatography with off-line detection by ultra high performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry in the study of the phenolic profile of *Lippia organoides*. **Journal of Chromatography A**, v. 1520, p. 83–90, 2017. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.09.004.
- LEYVA-LÓPEZ, N. et al. Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 187, p. 302–312, 2016. DOI: 10.1016/j.jep.2016.04.051.
- MARTINS, G. R. et al. Antifungal Phenylpropanoid Glycosides from *Lippia rubella*. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 3, p. 566–572, 2019. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00975.
- MERCADO, M. I. et al. *Lippia integrifolia*: Are there morphological, anatomical and biochemical differences among chemotypes? **Industrial Crops and Products**, v. 153, p. 112610, 2020. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112610.
- NONO, E. C. N. et al. A new flavone and a newly synthesized alkaloid from *Lippia rugosa* A. Chev (Verbenaceae). **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2022. DOI:

10.1080/14786419.2022.2051706.

NUNES, A. R. et al. Photoprotective potential of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 189, n. July, p. 119–123, 2018. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.10.013.

OLIVEIRA, A. S. et al. Investigation of Antioxidant Activity, Acute Toxicity and Anticholinesterasic Potential of *Lippia hirta* (Verbenaceae). **Revista Virtual de Quimica**, v. 11, n. 2, p. 432–448, 2019. DOI: 10.21577/1984-6835.20190033.

OLIVEIRA, G. T. et al. Phytochemical characterisation and bioprospection for antibacterial and antioxidant activities of *Lippia alba* Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae). **Natural Product Research**, v. 32, n. 6, p. 723–731, 2018. DOI: 10.1080/14786419.2017.1335727.

TIMÓTEO, P. et al. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. **Food Chemistry**, v. 175, p. 366–373, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.129.

**Apêndice 3.** Materiais suplementares do Capítulo 2.**Chemical characterization, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of *Lippia* L. species compared by chemometric calculations**

Carla de Fatima Alves Nonato<sup>a,b</sup>, Emerson Vinicius Silva de Melo<sup>b</sup>, Cicera Janaine Camilo<sup>b</sup>, Débora Odília Duarte Leite<sup>b</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>a,c</sup>, Joanda Paolla Raimundo e Silva<sup>d</sup>, Josean Fechine Tavares<sup>d</sup>, Daniela Ribeiro Alves<sup>e</sup>, Selene Maia de Moraes<sup>e</sup>, José Galberto Martins da Costa<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Biological Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE 63105-000, Brazil.

<sup>b</sup>Research Laboratory of Natural Products, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE 63105-000, Brazil.

<sup>c</sup>Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE 63105-000, Brazil.

<sup>d</sup>Multiuser Laboratory of Characterization and Analysis, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil.

<sup>e</sup>Chromatographic and Spectroscopic Analysis Laboratory, State University of Ceará, Fortaleza, CE 60714-903, Brazil.

\*Corresponding author at: Postgraduate Program in Biological Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE 63105-000, Brazil.

E-mail address: [galberto.martins@urca.br](mailto:galberto.martins@urca.br) (J.G. Martins da Costa).



**Table S1.** Compounds identified by HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> in ethanolic extracts of *L. alba*, *L. sidoides* and *L. gracilis*.

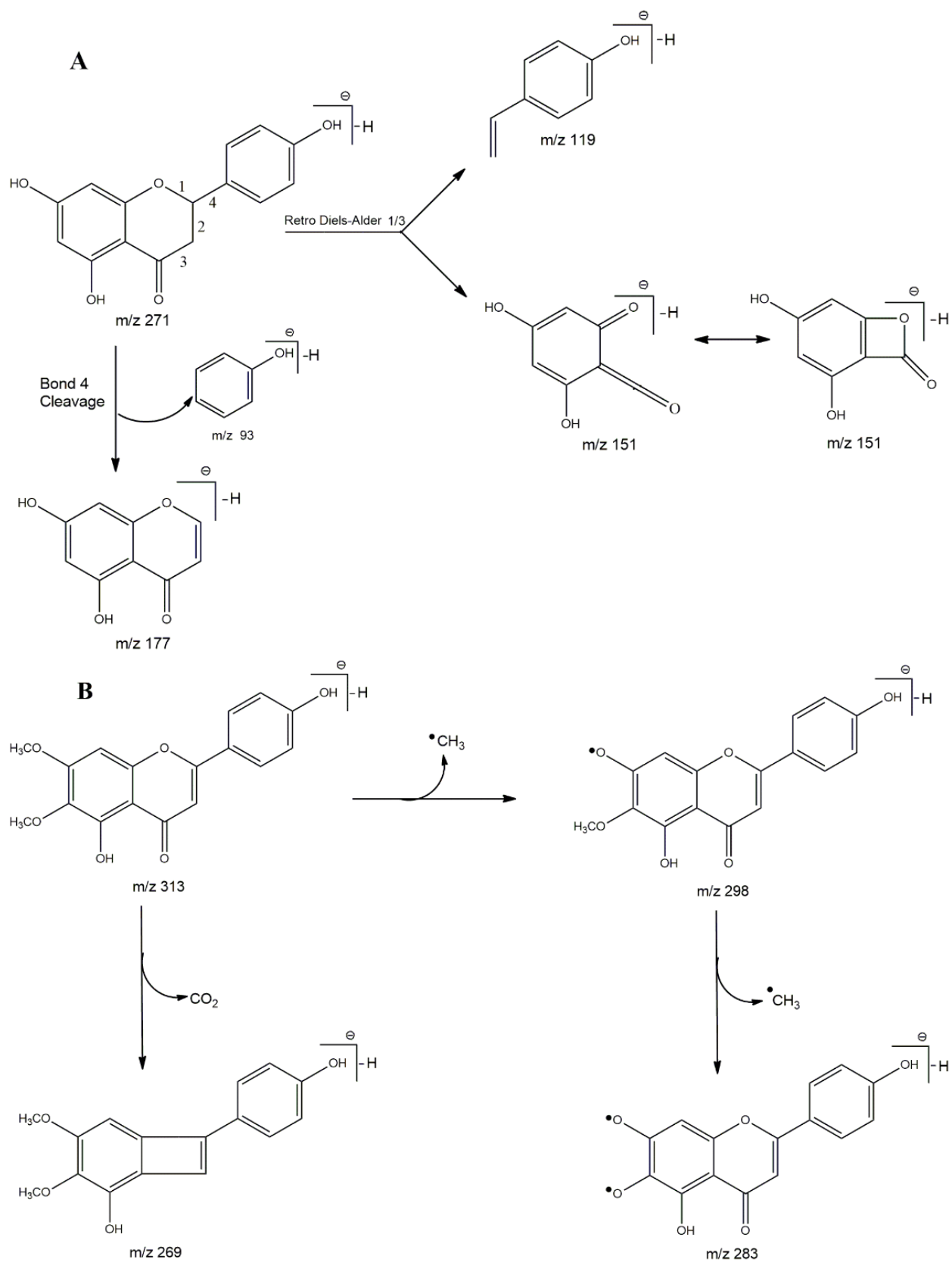
N°	R.T.	[M-H] <sup>-</sup>	Molecular formula	Error (ppm)	MS <sup>n</sup> m/z	Assignment	Extract	References
1	11.1	389.1083	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	1.6	MS <sup>2</sup> [389]: 227; 191; 165; 147	Monotropein	LaEE	(Heffels et al., 2017)
2	22.3	373.1138	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	0.7	MS <sup>2</sup> [373]: 211; 193; 167; 149; 123	Geniposidic acid	LaEE	(Zhou et al., 2010)
3	27.4	375.1294	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	0.8	MS <sup>2</sup> 411[M+Cl-H] <sup>-</sup> : 375 MS <sup>3</sup> [411→375]: 213; 169; 151	Loganic acid	LaEE	(Li et al., 2015)
4	31.4	405.1406	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> O <sub>11</sub>	0.9	MS <sup>2</sup> 451 [M+HCOOH-H] <sup>-</sup> : 405 MS <sup>3</sup> [451→405]: 373; 243 MS <sup>4</sup> [405→243]: 225; 123; 101	Shanzhiside methyl ester	LaEE	(Zhou et al., 2010)
5	36.2	387.1656	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> O <sub>9</sub>	1.2	MS <sup>2</sup> [387]: 207; 163	Tuberonic acid glucoside	LaEE	(Sánchez-Marzo et al., 2019)
6	38.8	593.0112	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	0.3	MS <sup>2</sup> [593,0]: 575,0; 503, 0; 473,0; 383,0; 353,0	Apigenin-6,8-C-diglucoside	LgEE	(El Sayed et al., 2016)
7	39.5	389.1452	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> O <sub>10</sub>	0.4	MS <sup>2</sup> 435[M+HCOOH-H] <sup>-</sup> : 389 MS <sup>3</sup> [435→389]: 227; 101	Loganin	LaEE	(Tao et al., 2018)
8	43.2	303.0519	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	1.6	MS <sup>2</sup> [303,0]: 284,9; 176,9; 124,8	Taxifolin	LsEE LgEE	(Santos et al., 2013)
9	43.4	449.1093	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	0.5	MS <sup>2</sup> [449,0]: 286,9 MS <sup>3</sup> [449,0→286,9]: 150,9 MS <sup>4</sup> [449,0→286,9→150,9]: 106,9	Eriodictyol-7-O-glicoside	LsEE	(Pereira et al., 2013)
10	43.4	447.0421	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	0.2	MS <sup>2</sup> [447,0]: 392,9; 356,9; 327,0	Orientin	LgEE	(Iswaldi et al., 2011)

11	44.1	447.0235	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	0.7	MS <sup>2</sup> [447,0]: 429, 0; 411, 0; 357,0; 327,0	Isoorientin	LgEE	(Iswaldi et al., 2011)
12	44.3	623.1989	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> O <sub>15</sub>	1.2	MS <sup>2</sup> [623]: 461; 315	Acteoside	LaEE	(Tóth et al., 2016)
13	45.8	431.0431	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	1.0	MS <sup>2</sup> [431,0]: 310,9; 340,9 MS <sup>3</sup> [431,0 → 310,9]: 282,9	Vitexin	LgEE	(Spínola et al., 2015)
14	47.2	451.1231	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	-2.6	MS <sup>2</sup> [451,0]: 288,9 MS <sup>3</sup> [451,0 → 288,9]: 270,9; 166,8; 124,9	3-Hydroxyphlorizin	LsEE	(Petkovska et al., 2017)
15	48.2	431.0169	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	0.9	MS <sup>2</sup> [431,0]: 413,0; 395, 0; 310,9; 341,0 MS <sup>3</sup> [431,0 → 310,9]: 282,9	Isovitexin	LgEE	(Spínola et al., 2015)
16	48.5	447.0940	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-1.3	MS <sup>2</sup> [447,0]: 284,9 MS <sup>3</sup> [447,0 → 284,9]: 240,9; 198, 8; 174,9; 150,8; 132,9	Luteolin-6- <i>O</i> -glicoside	LsEE LgEE	(Pereira et al., 2013)
17	49.5	286.9134	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0.4	MS <sup>2</sup> [286,9]: 269,0; 258,9; 243,0; 201,0; 124,9	Dihydrokaempferol	LgEE	(Mbakidi-Ngouaby et al., 2018)
18	50.3	507.1145	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> O <sub>13</sub>	0.1	MS <sup>2</sup> [507]: 345; 330; 315	Quercetagetin- dimethyl- <i>O</i> -hexoside	LaEE	(Olennikov et al., 2018)
19	51.9	435.1296	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	0.1	MS <sup>2</sup> [435,0]: 272,9 MS <sup>3</sup> [435,0 → 272,9]: 166,8	Phloridzin	LsEE	(Mena et al., 2012)
20	52.5	431.0994	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-2.4	MS <sup>2</sup> [431]: 269 MS <sup>3</sup> [431 → 269]: 225	Emodin-8- <i>O</i> -glicoside	LaEE LsEE	(Zhao et al., 2013)

21	53.2	505.1002	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> O <sub>13</sub>	2.8	MS <sup>2</sup> [505,0]: 329; 314; 299	Tricin-7- <i>O</i> -glucuronide	LaEE	(Marczak et al., 2016)
22	53.4	445.0764	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub>	2.8	MS <sup>2</sup> [445]: 269; 175 MS <sup>3</sup> [445→269]: 225; 183	Apigenin-7- <i>O</i> -glucuronide	LaEE	(Frišćić et al., 2016)
23	55.5	287.0596	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-2.0	MS <sup>2</sup> [287,0]: 268,8; 150,8; 124,9; 106,9	Eriodictyol	LsEE LgEE	(Kang et al., 2016)
24	60.6	271.0619	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	2.7	MS <sup>2</sup> [270,9]: 176,8; 150,8; 118,9	Naringenin	LaEE LsEE LgEE	(Kang et al., 2016)
25	61.4	300.9852	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	0.1	MS <sup>2</sup> [300,9]: 272,9; 178,8; 150,8	Quercetin	LgEE	(Chen et al., 2015)
26	62.3	285.0408	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	-1.3	MS <sup>2</sup> [284,9]: 266,9; 256,8; 242,9; 240,9; 216,9; 198,9; 174,9; 150,9; 132,9	Luteolin	LsEE LgEE	(Kang et al., 2016)
27	62.9	315.0502	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	2.7	MS <sup>2</sup> [315]: 300	Isorhamnetin	LaEE	(Falcão et al., 2012)
28	64.1	593.1489	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	-2.5	MS <sup>2</sup> [593,0]: 446,9; 284,9 MS <sup>3</sup> [593,0 →284,9]: 240,8; 198,7; 174,8; 150,9; 132,9	Luteolin-7- <i>O</i> -rutinose	LsEE	(Brito et al., 2014)
29	66.7	299.0555	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	2.1	MS <sup>2</sup> [299]: 284 MS <sup>3</sup> [299→284]: 256; 227; 212	Chrysoeriol	LaEE	(Zhong et al., 2019)
30	66.9	268.0459	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	-1.5	MS <sup>2</sup> [268,9]: 224,8; 226,9; 200,9; 150,9; 148,8	Apigenin	LsEE	(Gouveia & Castilho, 2011)
31	67.0	329.0662	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub>	1.6	MS <sup>2</sup> [329]: 314	Tricin	LaEE	(Zhong et al., 2019)

MS <sup>3</sup> [329→314]: 299; 285								
32	69.1	373.0925	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	1.1	MS <sup>2</sup> [373]: 358; 343 MS <sup>3</sup> [373→358]: 343 MS <sup>4</sup> [373→358 →343]: 328; 300	Dihydroxy- tetramethoxy flavone	LaEE	(Olennikov et al., 2018)
33	69.5	327.2166	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>5</sub>	3.4	MS <sup>2</sup> [327]: 309; 291; 229; 211, 209; 171	Oxo-dihydroxy- octadecenoic acid	LaEE	(Friščić et al., 2016)
34	70.0	313.0706	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	3.6	MS <sup>2</sup> [313,0]: 297,9; 283; 269	Cirsimaritin	LaEE LsEE LgEE	(Peter et al., 2015)
35	71.7	284.9821	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	0.6	MS <sup>2</sup> [284,9]: 190, 8; 164, 9; 118, 9	Sakuranetin	LgEE	(Ristivojević et al., 2015)
36	71.8	343.0823	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>	0.0	MS <sup>2</sup> [343]: 328, 313 MS <sup>3</sup> [343→328]: 313; 298; 285; 270	Dihydroxy- trimethoxyflavone	LaEE	(Olennikov et al., 2018)
37	72.4	254.9103	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	0.1	MS <sup>2</sup> [254,9]: 212,9; 186,9; 150,8; 144,8; 135,8; 124,9	Pinocembrin	LgEE	(Pellati et al., 2011)

R.T.: Retention time. LaEE: *Lippia alba* ethanolic extract; LsEE: *Lippia sidoides* ethanolic extract; LgEE: *Lippia gracilis* ethanolic extract.



## References

- Brito, A., Ramirez, J. E., Areche, C., Sepúlveda, B., & Simirgiotis, M. J. (2014). HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three *Citrus* Species Consumed in Northern Chile. *Molecules*, *19*, 17400–17421. <https://doi.org/10.3390/molecules191117400>
- Chen, Y., Yu, H., Wu, H., Pan, Y., Wang, K., Jin, Y., & Zhang, C. (2015). Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation Rule Exploration. *Molecules*, *20*, 18352–18366. <https://doi.org/10.3390/molecules201018352>
- El Sayed, A. M., Ezzat, S. M., El Naggar, M. M., & El Hawary, S. S. (2016). In vivo diabetic wound healing effect and HPLC–DAD–ESI–MS/MS profiling of the methanol extracts of eight Aloe species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *26*(3), 352–362. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.009>
- Falcão, S. I., Vale, N., Gomes, P., Domingues, M. R. M., Freire, C., Cardoso, S. M., & Vilas-Boas, M. (2012). Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: Uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. *Phytochemical Analysis*, *24*(4), 309–318. <https://doi.org/10.1002/pca.2412>
- Friščić, M., Bucar, F., & Pilepić, K. H. (2016). LC-PDA-ESI-MS<sup>n</sup> analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp. *Journal of Mass Spectrometry*, *51*(12), 1211–1236. <https://doi.org/10.1002/jms.3844>
- Gouveia, S., & Castilho, P. C. (2011). Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC-DAD(-)-ESI-MS<sup>n</sup> method. *Food Chemistry*, *129*, 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.078>
- Heffels, P., Müller, L., Schieber, A., & Weber, F. (2017). Profiling of iridoid glycosides in *Vaccinium* species by UHPLC-MS. *Food Research International*, *100*(3), 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.018>
- Iswaldi, I., Arráez-Román, D., Rodríguez-Medina, I., Beltrán-Debón, R., Joven, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Identification of phenolic compounds in aqueous and ethanolic rooibos extracts (*Aspalathus linearis*) by HPLC-ESI-MS (TOF/IT). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *400*, 3643–3654. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4998-z>
- Kang, J., Price, W. E., Ashton, J., Tapsell, L. C., & Johnson, S. (2016). Identification and

- characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of *Sorghum wholegrains* by LC-ESI-MSn. *Food Chemistry*, 211, 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.052>
- Li, Y., Liu, Y., Liu, R., Liu, S., Zhang, X., Wang, Z., Zhang, J., & Lu, J. (2015). HPLC-LTQ-orbitrap MSn profiling method to comprehensively characterize multiple chemical constituents in xiao-er-qing-jie granules. *Analytical Methods*, 7(18), 7511–7526. <https://doi.org/10.1039/C5AY00420A>
- Marczak, Ł., Znajdek-Awizeń, P., & Bylka, W. (2016). The use of mass spectrometric techniques to differentiate isobaric and isomeric flavonoid conjugates from *Axyris amaranthoides*. *Molecules*, 21(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules21091229>
- Mbakidi-Ngouaby, H., Pinault, E., Gloaguen, V., Costa, G., Sol, V., Millot, M., & Mambu, L. (2018). Profiling and seasonal variation of chemical constituents from *Pseudotsuga menziesii* wood. *Industrial Crops and Products*, 117, 34–49. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.069>
- Mena, P., Calani, L., Dall'Asta, C., Galaverna, G., García-Viguera, C., Bruni, R., Crozier, A., & Del Rio, D. (2012). Rapid and comprehensive evaluation of (Poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by UHPLC-MSn. *Molecules*, 17, 14821–14840. <https://doi.org/10.3390/molecules171214821>
- Olenikov, D. N., Chirikova, N. K., Kashchenko, N. I., Nikolaev, V. M., Kim, S. W., & Vennos, C. (2018). Bioactive phenolics of the genus *Artemisia* (Asteraceae): HPLC-DAD-ESI-TQ-MS/MS profile of the Siberian species and their inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 756. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00756>
- Pellati, F., Orlandini, G., Pinetti, D., & Benvenuti, S. (2011). HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 934–948. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.03.024>
- Pereira, O. R., Peres, A. M., Silva, A. M. S., Domingues, M. R. M., & Cardoso, S. M. (2013). Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC-UV and ESI-MS combined method. *Food Research International*, 54, 1773–1780. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.016>
- Peter, S. R., Peru, K. M., Fahlman, B., McMartin, D. W., & Headley, J. V. (2015). The application of HPLC ESI MS in the investigation of the flavonoids and flavonoid glycosides of a Caribbean Lamiaceae plant with potential for bioaccumulation. *Journal of Environmental Science and Health - Part B*, 50(11), 819–826.

<https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1058103>



- Petkovska, A., Gjamovski, V., Stanoeva, J. P., & Stefova, M. (2017). Characterization of the polyphenolic profiles of peel, flesh and leaves of *Malus domestica* cultivars using UHPLC-DAD-HESI-MSn. *Natural Product Communications*, 12(1), 35–42. <https://doi.org/10.1177/1934578x1701200111>
- Ristivojević, P., Trifković, J., Gašić, U., Andrić, F., Nedić, N., Tešić, Ž., & Milojković-Opsenica, D. (2015). Ultrahigh-performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (UHPLC-LTQ/Orbitrap/MS/MS) Study of Phenolic Profile of Serbian Poplar Type Propolis. *Phytochemical Analysis*, 26(2), 127–136. <https://doi.org/10.1002/pca.2544>
- Sánchez-Marzo, N., Lozano-Sánchez, J., Cádiz-Gurrea, M. L., Herranz-López, M., Micol, V., & Segura-Carretero, A. (2019). Relationships between chemical structure and antioxidant activity of isolated phytochemicals from lemon verbena. *Antioxidants*, 8, 324. <https://doi.org/10.3390/antiox8080324>
- Santos, S. A. O., Vilela, C., Freire, C. S. R., Pascoal-Neto, C., & Silvestre, A. J. D. (2013). Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from *Eucalyptus* wood. *Journal of Chromatography B*, 938, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.034>
- Spínola, V., Pinto, J., & Castilho, P. C. (2015). Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 173, 14–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.163>
- Tao, J., Zhao, M., Jiang, S., Pu, X., & Wei, X. (2018). Comparative metabolism of two major compounds in Fructus Corni extracts by gut microflora from normal and chronic nephropathy rats in vitro by UPLC-Q-TOF/MS. *Journal of Chromatography B*, 1073, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.12.025>
- Tóth, G., Barabás, C., Tóth, A., Kéry, Á., Béni, S., Boldizsár, I., Varga, E., & Noszál, B. (2016). Characterization of antioxidant phenolics in *Syringa vulgaris* L. flowers and fruits by HPLC-DAD-ESI-MS. *Biomedical Chromatography*, 30, 923–932. <https://doi.org/10.1002/bmc.3630>
- Zhao, H.-Y., Fan, M.-X., Wu, X., Wang, H.-J., Yang, J., Si, N., & Bian, B.-L. (2013). Chemical Profiling of the Chinese Herb Formula Xiao-Cheng-Qi Decoction Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 51, 273–285. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms138>




- Zhong, L., Yuan, Z., Rong, L., Zhang, Y., Xiong, G., Liu, Y., & Li, C. (2019). An Optimized Method for Extraction and Characterization of Phenolic Compounds in *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* Flower. *Scientific Reports*, 9, 7745. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44102-9>
- Zhou, T., Liu, H., Wen, J., Fan, G., Chai, Y., & Wu, Y. (2010). Fragmentation study of iridoid glycosides including epimers by liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization mass spectrometry and its application in metabolic fingerprint analysis of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(17), 2520–2528. <https://doi.org/10.1002/rcm.4643>

**ANEXOS**

**Anexo 1.** Certificado emitido pelo Comitê de Ética para Uso de Animais.

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ	<b>Comissão de Ética para o Uso de Animais</b> Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Itaperi CEP 60740-903 – fone 3101-9890 <a href="mailto:ceua.uece@uece.br">ceua.uece@uece.br</a> – <a href="http://www.uece.br/ceua">www.uece.br/ceua</a>	 GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ <small>Instituição de Ciência, Tecnologia &amp; Inovação Superior</small>			
<b>CERTIFICADO</b>					
<p>Certificamos que o Projeto intitulado “Uso do Zebrafish (Danio rerio) como modelo alternativo para investigação do potencial farmacológico de produtos naturais e sintéticos” registrado sob o número <b>04983945/2021</b>, tendo como pesquisador principal Jane Eire Silva Alencar de Menezes, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE). Este certificado expira-se em 31 de Julho de 2023.</p>					
<b>CERTIFICATE</b>					
<p>We hereby certify that the Project entitled “Use of Zebrafish (Danio rerio) as an alternative model for investigation of the pharmacological potential of natural and synthetic products” registered with the protocol <b>04983945/2021</b>, under the supervision of Jane Eire Silva Alencar de Menezes, is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE). This certificate will expire on July 31<sup>st</sup>, 2023.</p>					
<b>RESUMO</b>					
Vigência do projeto	Início	Agosto/2021	Fim	31 de julho de 2023	
Espécie/Linhagem	Danio rerio Zebrafish (paulistinha)				
Número de animais	6000	Peso	0,5 g	Idade	90-120 dias
Sexo	3000	Feminino	3000	Masculino	
Origem	Aquário certificado				
Metodologia	X	Adequada		Não adequada	
Cronograma	X	Adequado		Ausente/ Não adequado	
Ofício de encaminhamento	X	Presente		Ausente/ Não adequado	
Orçamento	X	Adequado		Ausente/ Não adequado	
Financiamento	Orgão de fomento	Recursos de Pesquisa e Parcerias			
	Edital ou N. processo	-			

Fortaleza, 05 de agosto de 2021.

  
 Vania Marilande Ceccatto  
 Presidente CEUA-UECE

**Anexo 2.** Comprovante do cadastro de acesso no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A79E3B0**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A79E3B0**  
 Usuário: **URCA**  
 CPF/CNPJ: **06.740.864/0001-26**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

**Espécie**

**Lippia alba**  
**Lippia sidoides**  
**Lippia gracilis**

Título da Atividade: **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA COMPARATIVA DE ESPÉCIES DO GÊNERO Lippia L. DO CARIRI CEARENSE**

**Equipe**

**Carla de Fatima Alves Nonato** **URCA**

Data do Cadastro: **10/05/2022 09:26:58**  
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **9:27** de **10/05/2022**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**