



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

CAROLINE SCABINI

**VARIAÇÃO SAZONAL E CIRCADIANA DE METABÓLITOS NÃO
VOLÁTEIS EM FOLHAS DE *LIPPIA ALBA* (MILL.) N.E. BR. EX BRITTON
& P. WILSON**

Vitória da Conquista, BA

2024

CAROLINE SCABINI

**VARIAÇÃO SAZONAL E CIRCADIANA DE METABÓLITOS NÃO
VOLÁTEIS EM FOLHAS DE *LIPPIA ALBA* (MILL.) N.E. BR. EX BRITTON
& P. WILSON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bióciências, Universidade Federal da Bahia, como requisito
para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Angélica Ferraz Gomes

Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA

2024

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

S277

Scabini, Caroline.

Varição sazonal e circadiana de metabólitos não voláteis em folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E.BR. ex Britton & P. Wilson. / Caroline Scanini. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2024.
52 f.; il.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Ferraz Gomes.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biociências) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2024.

1. Produtos Naturais. 2. Cromatografia líquida. 3. Acteosídeo. 4. Iridoides I. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Gomes, Angélica Ferraz. III. Título.

CDU: 576

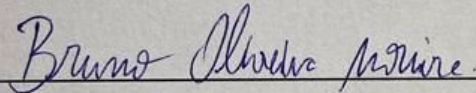
CAROLINE SCABINI

**VARIAÇÃO SAZONAL E CIRCADIANA EM COMPONENTES NÃO VOLÁTEIS
DE *Lippia alba* (MILL.) N.E.BR. EX BRITTON & P. WILSON**

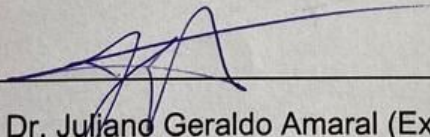
Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 15/04/2024.

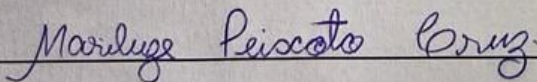
Profa. Dra. Angélica Ferraz Gomes (Orientadora)
(Universidade Federal da Bahia)



Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira (Examinador)
(Universidade Federal da Bahia)



Prof. Dr. Juliano Geraldo Amaral (Examinador)
(Universidade Federal da Bahia)



Profa. Dra. Mariluze Peixoto Cruz (Examinadora)
(Universidade Federal da Bahia)

“Ame a Jeová, seu Deus, de todo o seu coração, de toda a sua alma e de toda a sua força.”

Bíblia, Deuteronômio 6: 5

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois, ele está comigo a cada passo, como diz em provérbios (3: 5,6), “Confie em Jeová de todo o seu coração; não confie no seu próprio entendimento. Lembre-se dele em todos os seus caminhos, e ele endireitará as suas veredas.”

A Prof.^a Dr.^a Angélica Ferraz Gomes, minha orientadora, pelo seu apoio e incentivo. Nossas trocas contribuíram muito para o meu crescimento como aluna e pesquisadora. Sou imensamente grata por todas as oportunidades que você me proporcionou, pela sua confiança em mim e seu estímulo para eu alcançar o meu melhor.

Aos companheiros de laboratório, Gírlane e Brenda, pelas orientações e acompanhamento nas análises. A Luise e Jayne pela companhia, conselhos e por todo o cuidado que tiveram com esse trabalho. Sem vocês, este trabalho não teria fluído da mesma forma.

Ao técnico Flávio Mendes de Souza, por fazer da rotina de laboratório um ambiente feliz, divertido e principalmente obrigado por me ensinar lições valiosas que me ajudaram a crescer como pessoa e como profissional.

Aos colegas de mestrado: Nilma, Paulinne e Louise, por deixar tudo mais leve. Em especial a Gabriela por todo o seu apoio e carinho comigo, por estender sua mão amiga em um momento muito importante, serei eternamente grata.

Ao Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia - Campus Anísio Teixeira, pela dedicação em formar profissionais competentes.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências, pelo conhecimento e experiência adquiridos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo investimento.

A minha família, sou imensamente grata ao apoio incondicional. A minha mãe Helena, por cada palavra de incentivo. Aos meus irmãos Ana e Marcelo, por serem meu porto seguro e por sempre me acolher quando preciso.

As minhas amigas Jeane e Amanda, agradeço por cada palavra e conselho sábio compartilhado.

E por fim, eu agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho de mestrado. Obrigada!

RESUMO

SCABINI, Caroline. Variação sazonal e circadiana de metabólitos não voláteis em folhas de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson. 57 f.; il. 2024. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

O presente estudo descreve as variações sazonais e circadianas dos principais compostos das folhas de *Lippia alba*. O SPSS foi utilizado para identificar, quantificar e associar as variações nos metabólitos secundários desta espécie através da análise HPLC/DAD dos extratos hidroetanólicos das folhas de seis espécies selecionadas de *L. alba*. Para o estudo circadiano, as amostras foram coletadas em quatro horários diferentes do dia em cada estação do ano. Para o estudo sazonal, as amostras foram coletadas mensalmente dos mesmos indivíduos durante dois anos consecutivos (2018 e 2019). Essas amostras foram analisadas e quantificadas usando um método de HPLC validado para flavonoides, iridoides e fenilpropanoides. Mussaenosídeo, acteosídeo e tricina-7-*O*-diglucuronídeo mostraram uma correlação positiva moderada entre sua biossíntese e o índice de precipitação, enquanto a *epi*-loganina teve uma correlação negativa moderada. Acteosídeo apresentou correlação positiva moderada entre a temperatura mínima registrada e sua produção. Em comparação com estudos anteriores, houve uma redução drástica (cerca de 95%) na produção de tricina-7-*O*-diglucuronídeo e esta diferença pode ser atribuída ao envelhecimento da planta. Assim, os dados demonstraram que temperaturas mais baixas e precipitações elevadas poderiam favorecer a produção dos principais compostos ativos de *L. alba* (acteosídeo e tricina-7-*O*-diglucuronídeo) e que plantas mais velhas prejudicam a sua produção.

Palavras-chave: Acteosídeo. Iridoides. Cromatografia líquida. Produtos naturais. Precipitação. Temperatura. Tricina-7-*O*-diglucuronídeo.

ABSTRACT

SCABINI, Caroline. Seasonal and circadian variation of non-volatile metabolites in *Lippia alba* leaves (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson. 57 f.; il. 2024. Dissertação (Mestrado) - Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

The present study describes the seasonal and circadian variations of the major compounds from *Lippia alba* leaves. SPSS was used to identify, quantify, and associate the variations in the secondary metabolites of this species through HPLC/DAD analysis of the leaves hydroethanolic extracts of six selected *L. alba* specimens. For the circadian study, the samples were collected at four different daily hours in each year's season. For the seasonal study, the samples were collected monthly from the same individuals for two consecutive years (2018 and 2019). These samples were analyzed and quantified using a validated HPLC method for flavonoids, iridoids, and phenylpropanoids. Mussaenoside, acteoside, and tricin-7-*O*-diglucuronide showed a moderate positive correlation between their biosynthesis and the precipitation index, while *epi*-loganin had a moderate negative correlation. Acteoside showed a moderate positive correlation between the minimum registered temperature and its production. Compared with previous studies, a drastic reduction (about 95%) in the production of tricin-7-*O*-diglucuronide compared with previous study and this difference could be attributed to the plant's aging. Thus, the data demonstrated that lower temperatures and high rainfall could favor the production of the major *L. alba* active compounds (acteoside and tricin-7-*O*-diglucuronide) and that older plants harm their production.

Keywords: Acteoside. Iridoids. Liquid chromatography. Natural products. Rainfall. Temperature. Tricin-7-*O*-diglucuronide.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ca	Coeficiente Angular
CAT	Campus Anísio Teixeira
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE- DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
DP	Desvio Padrão
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMS	Instituto Multidisciplinar em Saúde
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
min	Minuto
MeOH	Metanol
PASS	Previsão do Espectro de Atividade Para Substâncias
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
R²	Coeficiente de Determinação
RPM	Rotações Por Minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
SPSS	Statistical Package for the Social Science - Pacote Estatístico Para as Ciências Sociais
SUS	Sistema de Saúde Pública
UFBA	Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
	Biodiversidade	13
	Utilização de produtos naturais pela população	13
	Necessidade de adequação dos produtos naturais.....	14
	Política nacional de medicamentos fitoterápicos.....	14
	Caracterização da espécie <i>Lippia alba</i>	15
	Família Verbenácea	15
	Fitoquímica.....	16
	Quimiotipos.....	16
	Atividade Farmacológica	19
	Influência de fatores climáticos nas plantas.....	19
	Ciclo circadiano	19
	Variações na produção de metabólitos secundários nas plantas.....	20
3	OBJETIVOS	25
	Objetivo Geral	25
	Objetivos Específicos	25
4	MATERIAIS E MÉTODO	26
	Obtenção do extrato etanólico.....	26
	Materiais, solventes e reagentes	26
	Coleta do material vegetal	26
	Preparo do extrato	26
	Preparo das amostras para injeção no CLAE-DAD	27
	Análise dos componentes fixos	27
	Método analítico	27
	Análise dos componentes	28
	Análise estatística.....	29
	REFERÊNCIAS	31
	CAPÍTULO 1.....	36
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52

1 INTRODUÇÃO

A *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown pertence à família Verbenaceae, conhecida popularmente como erva cidreira. É um subarbusto aromático amplamente utilizado pela população devido ao seu emprego no uso medicinal (FÉLIX-SILVA et al., 2012). Diversas propriedades têm sido atribuídas ao uso da *L. alba* quando utilizada na forma de chás, macerada em compressa e banhos, dentre elas se destacam as ações antiespasmódica, antipirética, anti-inflamatória, enemagoga, diaforética, analgésica e sedativa (AGUIAR et al., 2008).

Estudos realizados com as folhas desta espécie demonstraram ação antioxidante e atividades antibacterianas (OLIVEIRA et al., 2018; PORFÍRIO et al., 2017) analgésica e anti-inflamatória (VIANA et al., 1998) atuando no sistema cardiovascular (GAZOLA et al., 2004) com efeitos sedativos e com potencial relaxante motor (DO VALE et al., 2002) ansiolítico através da modulação do receptor GABA (NONATO et al., 2023; ZÉTOLA et al., 2002).

Como descrito, a *Lippia alba* tem apresentado diversas evidências de seu efeito ansiolítico e com potencial para tratamento de distúrbios como a insônia. Esta planta se destaca por ser uma espécie nativa de fácil manejo e cultivo, diferentemente da maioria das espécies atualmente utilizadas para esses distúrbios, que são exóticas (HENNEBELLE et al., 2008; ZÉTOLA et al., 2002; PEREIRA et al., 2015).

As classes dos metabólitos secundários identificados nos compostos fixos da *L. alba* que podem estar relacionadas com esses efeitos destacados são iridoides, fenilpropanoides e flavonoides, sendo estes os constituintes majoritários, podendo variar o teor de cada um deles (GOMES et al., 2019; TIMÓTEO et al., 2015). Em um estudo anterior realizado por Gomes e colaboradores o acteosídeo foi sugerido como marcador biológico, e os resultados da previsão do espectro de atividade para substâncias - PASS apontaram para uma possível ação ansiolítica para este composto (ALMEIDA et al., 2023; GOMES et al., 2019).

O acteosídeo pode ser classificado tanto como um marcador analítico quanto marcador ativo, isso de acordo com a RDC Nº 26 de 13 de maio de 2014 que classifica

que um marcador pode ser: uma substância ou classe de substâncias utilizada como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico. Sendo o marcador do tipo ativo, quando relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo, ou analítico, quando não demonstrada, até o momento, sua relação com a atividade terapêutica do fitocomplexo (BRASIL, 2014).

Portanto, evidencia-se a necessidade de investigar sobre os diversos fatores que podem influenciar a produção desses compostos. Entre esses fatores, destaca-se a sazonalidade, ciclo circadiano, temperatura, precipitação, condições de cultivo e a idade da planta (BARROS et al., 2009; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). No entanto, estudos sobre a influência destes fatores na produção de metabólitos secundários têm sido conduzidos predominantemente em espécies de regiões temperadas e que apresentem valor comercial (BOS et al., 1998; FILIPPINI et al., 2010; ROCA-PÉREZ et al., 2004).

Desse modo, a realização de estudos fitoquímicos, aliado com estudos de sazonalidade em uma planta com potencial medicinal, é de grande importância. Principalmente para conhecer e compreender a planta alvo, a fim de obter seu perfil, identificando os principais compostos de interesse. Além de estabelecer um período adequado do ano em que este composto estará presente na planta em concentrações adequadas para o uso em um fitomedicamento.

Devido à escassez de evidências que abordam variáveis de sazonalidade e ritmos circadianos, este trabalho é considerado inédito e pretende otimizar o cultivo desta espécie. Assim, este estudo tem como objetivo identificar, quantificar e associar a os metabólitos secundários presentes nas folhas de *L. alba*, para apoiar o desenvolvimento de fitoterápicos para o tratamento da ansiedade. Para obter a matéria-prima desta espécie com maiores teores de bioativos, este trabalho realizou um estudo químico sazonal e circadiano dos compostos não voláteis de *Lippia alba*, com foco no acteosídeo. Além disso, foram analisados a influência da idade das plantas e de fatores climáticos, tais como precipitação e temperatura, na produção dos ativos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Biodiversidade

O Brasil ocupa o primeiro lugar na lista dos 17 países megadiversos do mundo, abrigando cerca de 20% de todas as espécies de animais, vegetais e microrganismos do planeta (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2018). Essa diversidade pode ser vista na grande variedade e na complexidade de seus seis biomas, sendo eles: o Pantanal, a Floresta Amazônica, o Cerrado, a Mata Atlântica, a Caatinga e o Pampa (PIMENTEL et al., 2015). Todos eles apresentando diferentes zonas climáticas além de conter espécies endêmicas. Essa riqueza desperta o interesse político, cultural, social e econômico, tendo em vista que esse material tão único pode ser usado na produção de alimentos, medicamentos e em diversos outros biomateriais. (ARAUJO; ROCHA, 2018; BRUNO; MATOS, 2021). Somente no Brasil foram catalogadas cerca de 60 mil espécies de plantas. Contudo, somente uma pequena parcela foi estudada com a intenção de conhecer e descrever os seus compostos bioativos e poucas espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2018).

Utilização de produtos naturais pela população

A utilização de plantas com propriedades medicinais não é algo recente, historicamente há muitos relatos e registros do uso de plantas e ervas para prevenção, tratamento ou cura de doenças (CAJAIBA et al., 2016). Já nas navegações e descobertas de continentes muitas plantas que eram utilizadas por nativos passaram a ser usadas pelos europeus (TULER, 2011).

O conhecimento e a tradição de alguns povos representam um valor inestimável. No entanto, muito desse conhecimento foi sendo perdido com o tempo. Os motivos podem ser variados, como o extermínio de alguns povos que não deixaram registros, a introdução de novos hábitos a estas culturas ou pelo uso de outros meios da medicina moderna (AMOROZO, 2002). Com isso, muito se discute sobre a importância de estudos como os etnobotânicos. Os estudos etnobotânicos buscam estudar a relação entre homem e a sociedade com as plantas e seus saberes tradicionais difundidos entre as gerações (AGUIAR, 2013).

Necessidade de adequação dos produtos naturais

Para Mattos e colaboradores (2018), a prática da fitoterapia permite à população o contato com sua história, resgatando costumes tradicionais e culturais (MATTOS et al., 2018). Podemos descrever os medicamentos fitoterápicos como sendo todos aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais. Porém, como todo medicamento regulamentado, o fitoterápico também precisa apresentar algumas características, tais como, o conhecimento da sua eficácia, dos riscos de seu uso, pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (RÊGO; REIS; SILVA, 2021).

Política nacional de medicamentos fitoterápicos

No Brasil, no ano de 2006 através do Decreto da Presidência da República nº. 5.813, de 22 de junho, foi criada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Nesse mesmo ano a Fitoterapia foi integrada nacionalmente no Sistema Único de Saúde (SUS), através da publicação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC). Este documento foi muito importante para o desenvolvimento da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no País, pois desde a sua implementação, surgiram novas diretrizes que possibilitaram assegurar e regulamentar o uso de fitoterápicos pelo SUS (FIGUEREDO et al., 2014; OSHIRO et al., 2016). Essas medidas visam, principalmente, a padronização nos usos desses medicamentos pela população. Além de incentivar a pesquisa dando visibilidade a biodiversidade do país e estimulando a adoção da Fitoterapia nos programas de Saúde Pública (CACCIA-BAVA et al., 2017).

Devido o crescimento e desenvolvimento da química na segunda metade do século XX, novas substâncias foram sendo descobertas e isoladas em laboratórios, possibilitando o surgimento de novos produtos sintetizados a partir dessas moléculas. Esse processo levou a substituição do uso de plantas pelo uso de medicamentos sintetizados (FIGUEREDO et al., 2014). Contudo, o desenvolvimento da Indústria Farmacêutica também está diretamente ligado ao incentivo da iniciação científica e tecnológica no país, acarretando assim no crescimento econômico e social (GUILHERMINO; QUENTAL; BOMTEMPO, 2012).

Caracterização da espécie *Lippia alba*

Família Verbenácea

A família Verbenaceae J. St.-Hil. compreende atualmente 32 gêneros e cerca de 800 espécies distribuídas nas Américas, Ásia, África, Europa e Oceania (SALIMENA et al., 2024). Sua distribuição ocorre em ambos os hemisférios, especialmente nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do hemisfério Sul e menos representada no hemisfério Norte (LÓPEZ-VILLAFRANCO et al., 2017). Essas plantas são caracterizadas por serem herbáceas, subarborescentes, arbustivas, lianáceas a arbóreas. Possuem folhas opostas ou verticiladas, simples ou compostas, sem estípulas. Suas flores são monóclinas ou díclinas por aborto, reunidas em inflorescências racemosas ou cimosas, ovário súpero (CAMILLO, 2016).

No cerrado Brasileiro é onde se concentra a maior riqueza abrigando 14 gêneros e 160 espécies, onde se destacam os campos rupestres da Cadeia do Espinhaço com várias espécies endêmicas (CRUZ; SALIMENA, 2017; SALIMENA et al., 2024). Presente nessa família está o gênero *Lippia*. Os dois principais centros de diversidade e de distribuição desse gênero no Brasil estão localizados na Cadeia do Espinhaço, no estado de Minas Gerais e na Chapada Diamantina, no estado da Bahia (CAMILLO, 2016). Segundo Sousa (2008), dentre as espécies de *Lippia* que podemos encontrar nestes locais, se destacam: *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown; *Lippia lupulina* Cham; *Lippia hermannioides* Cham; *Lippia sidoides* Cham; *Lippia rubella* (Moldenke) T.R.S. Silva & Salimena, *Lippia rosella* Moldenke; *Lippia diamantinensis* Glaziou; *Lippia rotundifolia* Cham.; *Lippia pseudothea* (A. ST. -Hil) Schauer, *Lippia martiana* Schauer; *Lippia glandulosa* Schauer; *Lippia corymbosa* Cham. e *Lippia filifolia* Mart. & Schauer (SOUSA, 2008).

Diversas espécies pertencentes à esse gênero são empregadas na medicina popular e por comprovação científica apresentam propriedades medicinais. Estudos farmacológicos vêm sendo realizados, principalmente, com a *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. Ex Britton & P. Wilson (Figura 1). Dentre os quais podemos citar o teste de atividade no sistema cardiovascular (GAZOLA et al., 2004; MAYNARD et al., 2011), atividade antioxidante (HENNEBELLE et al., 2008), ansiolítica (HATANO et al., 2012; ZÉTOLA et al., 2002), analgésica e anti-inflamatória (VIANA et al., 1998), antibacteriana (AGUIAR et al.,

2008), antiviral (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005), anti-úlceras (PASCUAL, 2001) e anticonvulsivante (SOARES, 2001).



Figura 1: *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex P. Wilson. Foto: (ALMEIDA et al., 2023)

Fitoquímica

A *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson é uma espécie medicinal muito utilizada pela população brasileira, devido às propriedades calmante, antiespasmódica suave, analgésica, sedativa, ansiolítica e levemente expectorante (GOMES, 2017). Estudos dos metabólitos secundários desta espécie vêm se desenvolvendo nos últimos 30 anos. Estes compostos além de desempenharem um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes também representam uma fonte importante de substâncias farmacologicamente ativas (FUMAGALI et al., 2008).

Quimiotipos

Devido a variação na composição química do óleo essencial de diferentes espécimes de *L. alba* foi sugerida a nomenclatura de quimiotipos, separados por seus elementos predominantes. O quimiotipo I é caracterizado pelos elevados teores de mircenos (**1S**) e citral (**2S** e **3S**), tipo II caracteriza pelos teores elevados de limoneno (**4S**) e citral e o quimiotipo III são caracterizadas pela presença de limoneno e carvona (**5S**). Além

desses três principais quimiotipos, existem outros descritos na literatura como, por exemplo, o quimiotipo cujo componente majoritário é o linalol (**6S**) (MATOS et al., 1996).

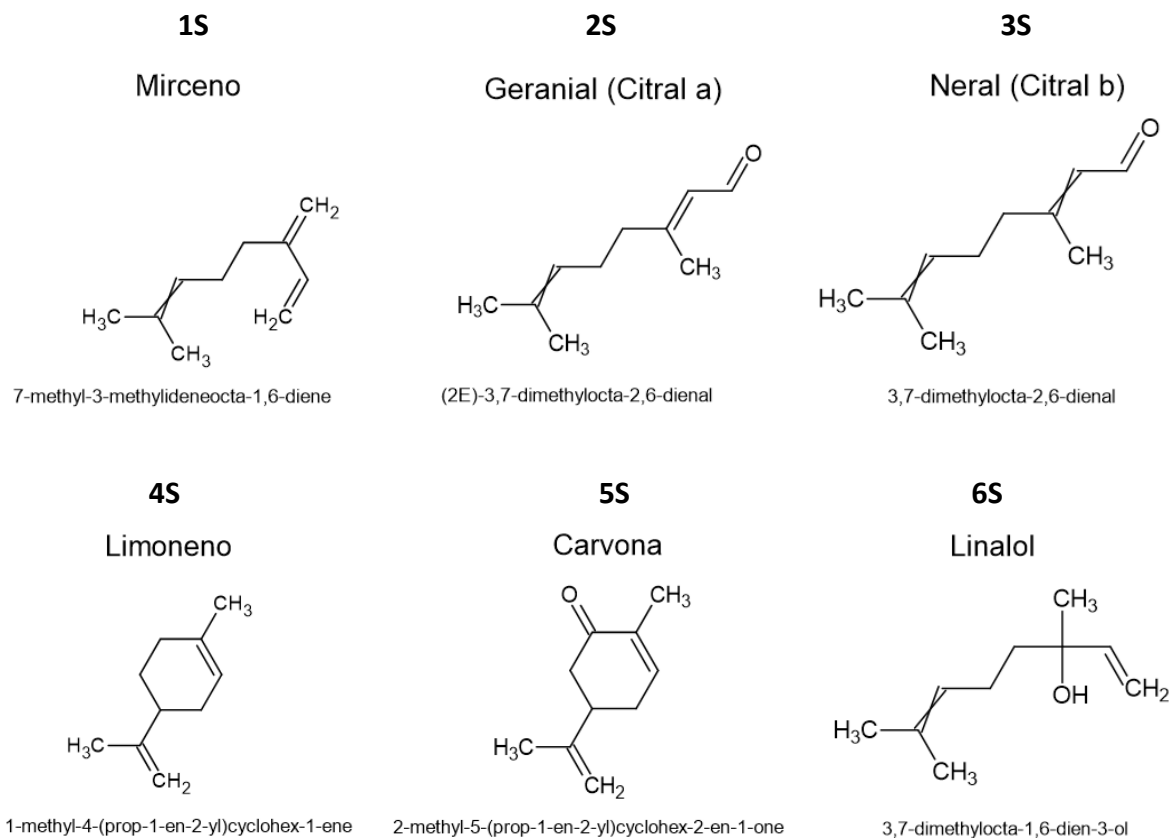


Figura 2: Principais compostos voláteis presentes no óleo essencial de *Lippia alba*

A maioria dos estudos referentes à composição química das espécies de *Lippia* são focadas principalmente em seus constituintes voláteis. Por se tratar de uma espécie promissora a *L. alba* (Mill.) N. E. Brown apresenta um crescente nos números de estudos fitoquímicos e farmacológicos (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011). Desta forma, alguns destes estudos dão destaques aos componentes não voláteis presentes na planta, relatando a presença dos metabólitos secundários identificados nos compostosfixos da *L. alba*, dentre eles estão os compostos das classes fenilpropanoides, iridoides e flavonoides, sendo estes os constituintes majoritários, podendo variar o teor de cada um deles (TIMÓTEO et al., 2015; ZÉTOLA et al., 2002).

Para este estudo foi dado destaque para cinco dos principais compostos não voláteis encontrados na *L. alba*. Na figura 3 está ilustrado as estruturas químicas dos compostos que foram analisados.

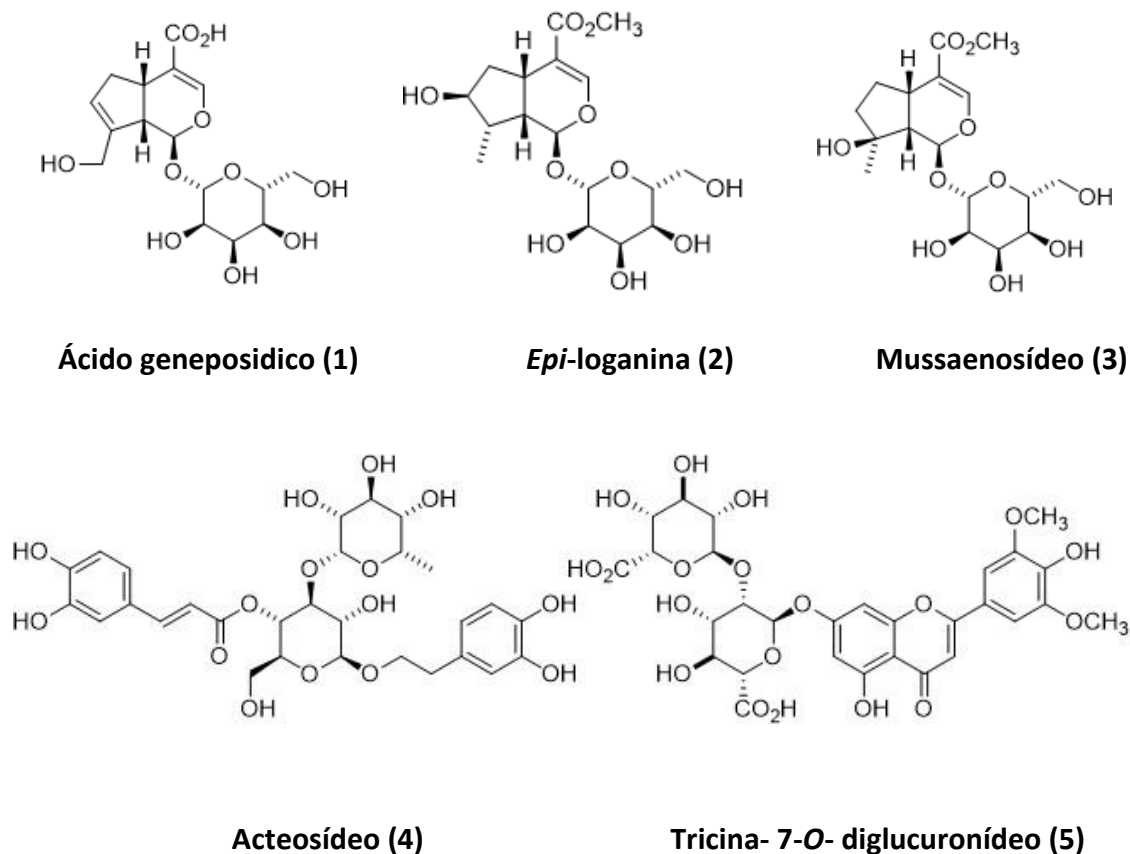


Figura 3 - Compostos não voláteis na espécie *L. alba* e suas respectivas estruturas.

Em estudo anterior a esse, com a mesma espécie realizado por Gomes e colaboradores (2019), foi possível observar variações na produção de componentes fixos nos extratos. No inverno, houve a predominância do fenilpropanoide acteosídeo (quase 90%) e no verão do flavonoide tricina-7-O-diglucuronídeo (GOMES et al., 2019). Um dos componentes majoritários da *L. alba*, o acteosídeo, apresenta atividade antioxidante e foi evidenciado seus efeitos no Sistema Nervoso Central (SNC) através do ensaio de afinidade pelos receptores dopaminérgicos, benzodiazepínicos e morfínicos (DAELS-RAKOTOARISON et al., 2011). Em estudos utilizando a modelagem molecular foi observado que dentre os componentes fixos, o acteosídeo foi o que demonstrou maior afinidade pelos receptores GABA (envolvidos no efeito ansiolítico) e o limoneno foi o componente volátil com maior afinidade por esse mesmo receptor (ALMEIDA et al., 2023). Essas substâncias podem ser consideradas como importantes marcadores para esta espécie, uma vez que, além de apresentar atividade biológica, são também os compostos majoritários em diversas amostras desta planta (GOMES et al., 2019; TIMÓTEO et al., 2015). Desta maneira esses dados reforçam a hipótese que tanto os componentes fixos quanto os voláteis desta planta

atuam de maneira sinérgica nas atividades biológicas atribuídas a esta espécie. Portanto, o estudo da variação dos componentes não voláteis de *L. alba* é de suma importância para se estabelecer o melhor período de coleta da mesma.

Atividade Farmacológica

Existem muitos estudos etnofarmacológicos e etnofarmacobotânicos com a espécie *Lippia alba*. Dentre os quais é possível citar os ensaios sobre o potencial analgésico, que mostraram que o tratamento com os extratos de folhas de *Lippia alba*, quando administrados por via oral a camundongos, foram eficazes na redução de contorções abdominais (DI STASI et al., 1988). Além desse, um estudo realizado por Gurgel e colaboradores mostrou que citral, limoneno e mirceno apresentaram efeitos sedativos e com potencial relaxante motor (DO VALE et al., 2002).

Extrato etanólico e frações obtidas de partes aéreas frescas e secas de *Lippia alba*, foram testados para identificar sua capacidade antioxidante e atividades antibacterianas. Seu extrato etanólico mostrou atividade contra cepas de referência e multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, além de apresentar atividade antibacteriana, mesmo contra bactérias Gram-positivas multirresistentes, e efeito antioxidante no ensaio de DPPH (OLIVEIRA et al., 2018). O extrato de *L. alba* também foi submetido à testes para identificar efeito ansiolítico em peixes-zebra adultos, e os resultados comprovaram que o extrato não se mostrou tóxico após 96 horas de exposição, e apresentou efeito ansiolítico através da modulação do receptor GABA (NONATO et al., 2023).

Em trabalho publicado por Porfírio e colaboradores foi avaliada as atividades antimicrobianas e antibiofilme *in vitro* do óleo essencial de *Lippia alba* e seus principais componentes (citral e carvona) contra *Staphylococcus aureus*, e os resultados apontaram um promissor potencial antibacteriano e antibiofilme (PORFÍRIO et al., 2017).

Influência de fatores climáticos nas plantas

Ciclo circadiano

As plantas apresentam diversos tipos de mecanismos de defesa, os quais podem ser divididos em dois tipos, sendo eles: os mecanismos bioquímicos e os mecanismos estruturais

Esses mecanismos de defesa são necessários para o desenvolvimento da planta e também para a proteção contra a ação de predação de animais herbívoros e/ou de ataque de agentes patógenos. Alguns exemplos desses mecanismos são a presença de apêndices epidérmicos como os espinhos e tricomas e/ou também de compostos como as toxinas e alguns compostos voláteis. Entretanto, por se tratarem de organismos sésseis, as plantas precisam perceber com precisão os sinais ambientais, como a luz e a temperatura, para sobreviver e se adaptar ao ambiente. Desta maneira, as plantas possuem os relógios circadianos, que são mecanismos endógenos de cronometragem que permitem aos organismos antecipar e se preparar para as mudanças diárias e sazonais nos ambientes em que estão (INOUE; ARAKI; ENDO, 2018).

O relógio circadiano presente nas plantas também desempenha um papel na percepção sazonal da duração do dia. Ele permite que as plantas estabeleçam de maneira ideal o melhor momento para acontecer as transições de desenvolvimento, como exemplo a sua reprodução. Além disso, este relógio restringe ou protege a sensibilidade da resposta de uma planta aos sinais ambientais, como luz e stresse, as horas específicas do dia, garantindo que a planta consiga distinguir entre flutuações normais e mudanças de longo prazo (ADAMS; CARRÉ, 2011).

Por se tratar de algo complexo o entendimento de como funciona a interação entre o mecanismo do relógio e o ambiente na qual a planta está inserida, além das integração de estímulos não-fóticos, se faz necessário que trabalhos sejam realizados para se ter uma compreensão mais completa de como o sistema circadiano está incorporado na fisiologia das plantas (MCWATTERS; DEVLIN, 2011) .

Variações na produção de metabólitos secundários nas plantas

Estudos de perfis fitoquímicos são de interesse para a ciência, pois esses estudos realizam uma validação de plantas medicinais que são amplamente utilizadas e ainda proporciona a descoberta de novas espécies com perfis promissores para obtenção de novos fitoterápicos. A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos das espécies vegetais e/ou avaliar sua presença nos mesmos. De acordo com Pavarini (2012), os metabólitos especiais das plantas são um grupo de classes de compostos que ocorrem naturalmente, são biossintetizados por diferentes via

Bioquímicas, o conteúdo e a regulação das plantas são fortemente suscetíveis a influências ambientais e pode ser alterado frente à potenciais predadores. Ele destaca ainda que os factores abióticos e bióticos podem ser especificamente induzidos por meio de vários mecanismos, que criam variação na acumulação ou biogênese de metabólitos secundários. O acúmulo de compostos bioativos permite que as plantas se comuniquem e reajam a fim de superar ameaças iminentes (PAVARINI et al., 2012).

Como visto, vários fatores podem afetar o perfil fitoquímico das plantas. Desta maneira alguns trabalhos, principalmente os que possuem plantas com potencial medicinal, vem sendo estudadas mais a fundo, como é o caso do estudo realizado com três subespécies de *Hypericum perforatum*, que teve como objetivo realizar a perfilação dessas plantas em diferentes fases de maturação, avaliando uma possível alteração em seus metabólitos secundários. Como resultado o estudo indicou que *H. perforatum* subsp. *perforatum* é mais rico em metabólitos secundários em detrimento das demais subespécies analisadas. O estudo ainda indicou que durante a fase de desenvolvimento o perfil varia, tendo as hipericinas, hiperforinas e flavonoides atingindo seu pico em diferentes estágios o que dificulta a padronização de um extrato (FILIPPINI et al., 2010).

Em um estudo realizado com sete taxinas (alcaloides): taxol, bacatina III, 10-desacetiltaxol, 10-desacetilbacatina III, 7-xilosil-10-desacetiltaxol, cefalomanina e brevifoliol, presentes em extratos tanto da casca quanto na folhagem da espécie *Taxus brevifolia*, mostrou que as concentrações dessa taxinas caíam quando analisadas do caule para a ponta do ramo (VANCE; KELSEY; SABIN, 1994). Outro trabalho realizado com a espécie *Taxus baccata* L. durante o período de outono- primavera avaliava as concentrações de quatro taxóides: bacatina III, paclitaxel, cefalomanina e 10-desacetilbacatina III (10-DAB III) evidenciou que fatores epigenéticos tais como a data de coleta (e, portanto, filogênese) e tipo de tecido vegetal, determinam os níveis de taxoides durante o final do período outono-primavera nesta espécie (GLOWNIAK; MROCZEK; ZOBEL, 1999). Mais dois trabalhos que contribuem para essa descobertas são os de Veselá (1999), que avalia a variação sazonal realizado com a casca de *Taxus baccata* L. indica que as concentrações dos taxoides variam sazonalmente nessas plantas, e o trabalho de Hook e colaboradores (1999), que avaliou a variação sazonal de taxoides em brotos de teixo europeu *Taxus baccata*, através de mudas durante um ano, divididas em agulhas e caules.

As análises revelaram que as agulhas produziram níveis significativamente mais elevados de taxoides do que os caules. Contudo, não foi possível obter nenhuma conclusão quanto à época ideal do ano para realizar a colheita com quantidade favoráveis, pois as concentrações variam de árvore para árvore, dependendo da variedade, localização e tipo de taxoide (HOOK et al., 1999; VESELÁ et al., 1999).

No estudo de produção sazonal realizado no ano de 2004, com 10 populações naturais de *Digitalis obscura*, localizados em três cinturões bioclimáticos (Na classificação de Alisov, o planeta é dividido em sete cinturões climáticos com base na atuação de massas de ar: equatorial, subequatorial, tropical, subtropical, temperado, subpolar e polar) demonstraram que, os glicosídeos primários que representavam cerca de 50–60% do total de cardenólídeos presentes nestas espécies não variou entre as populações ou com a idade das folhas, porém eles apresentaram um aumento no verão e uma diminuição no inverno (ROCA-PÉREZ et al., 2004).

A ideia de realizar estudos fitoquímicos aliado juntamente com estudos de sazonalidade em uma planta com potencial medicinal é muito importante. Inicialmente para conhecer e compreender bem a planta foco, a fim de obter seu perfil, separando os compostos de principal interesse e posteriormente com o estudo sazonal estabelecer um período adequado do ano em que este composto vai estar presente na planta em concentrações adequadas para o uso em um fitomedicamento. Isso pode ser visto no estudo feito entre o período de 1989 a 1993 com a planta *Valeriana officinalis*, onde foi avaliado seu óleo essencial (ácido valerênico e derivados, e valepotriatos). Com base no estudo realizado durante todos esses anos finalmente no ano de 1993 após uma sequência de seleções obtiveram um material vegetal que apresentava teor satisfatório de óleo essencial (0,9%) combinado com alto teor de ácido valerênico e derivados (0,5%) que pode ser colhido em setembro do ano após a semeadura (BOS et al., 1998). Outro trabalho que ajuda a estabelecer o melhor período do ano para realizar a coleta do material foi um estudo realizado com cultivares de *Taxus*. O material coletado entre o meio-dia e as 20h00 forneceram biomassa com um elevado teor de taxanos totais (0,099–0,102%) sem sacrificar o rendimento de outro taxanos. Os dados obtidos a partir desse estudo sazonal mostraram que a melhor altura para colher material da planta para a produção desse taxano

é aproximadamente um mês a partir do início do crescimento (ELSOHLY et al., 1997).

Até mesmo fatores como a época de floração das plantas pode influenciar o metabolismo secundário das plantas. Em um estudo que avaliava a variação sazonal da espécie *Antirrhinum majus*, conhecida popularmente como boca-de-leão, boca-de-lobo ou boca-de-peixe, selecionou quatro iridoides encontrados na espécie, sendo eles: antirrinósídeo, antirrida, 5- glucosil-antirrinósídeo e linariosídeo. Os resultados apontaram uma distribuição bimodal (distribuição de probabilidade contínua com duas modas diferentes) para a distribuição dos teores de iridoides durante o ano, além de uma baixa no teor de todos os compostos na época de floração. Este padrão indicou uma mudança na biossíntese da planta, embora nenhuma explicação foi dada para o fenômeno (DRØHSE HØGEDAL; MØLGAARD, 2000).

Temperaturas extremas e a radiação também podem ser apontadas como fatores que podem gerar alterações nos componentes secundários das plantas. Um experimento realizado com *Arnica montana* L. cv. ARBO indicou uma variação nos compostos fenólicos dessa planta, causada pela variação altitudinal. Em níveis mais altos houve um aumento significativo de ortodifenólicos na planta, o que resultava em um aumento na capacidade antioxidante dos tecidos das mesmas. Uma teoria levantada para o aumento deste composto pode ser a queda de temperatura resultante do aumento da altitude. Já o experimento realizado com a radiação UV-B aumentada surpreendentemente não desencadeou qualquer alteração nos metabólitos fenólicos da Arnica (ALBERT et al., 2009).

Em contraponto a esse estudo onde juntamente com a queda de temperatura houve um aumento na produção do composto o estudo feito por Roca-Pérez e colaboradores (2004) analisou correlação entre a biomassa vegetal e o teor de cardenolídeo (composto secundário). Foi observado, de acordo com a distribuição climática das populações, que em algumas condições ambientais como as mais frias, podem levar a diminuições acentuadas na biomassa vegetal e essa redução acarreta juntamente em uma redução na produtividade de seus compostos totais (ROCA-PÉREZ et al., 2004).

O estresse que a planta sofre no ambiente é outro exemplo de fator que pode levar a mudança no perfil metabólico de uma planta. No trabalho realizado através de CLAE- DAD-EM/EM e CLAE-DAD dos perfis de metabólitos secundários de extratos das folhas de *Lychno*

phora ericoides Mart. avaliava as propriedades citotóxicas e antioxidantes da espécie. Foi feito o preparo de extratos com plantas coletadas de sete localidades diferentes. O que chamou a atenção dos autores foi, principalmente, encontrar um metabolismo secundário defensivo amplificado, e apresentando as mais altas bioatividades antioxidantes e citotóxicas justamente nas plantas que foram coletadas nas interfaces entre dois tipos diferentes de vegetação (GOBBO-NETO et al., 2010). Essas informações ajudam a melhor compreender como funciona o metabolismo nas plantas. Em situações de grande estresse devido à variação dos agentes agressores a planta pode tender a amplificar sua produção e armazenamento de metabólitos especiais defensivos.

Muitas questões precisam ser levadas em consideração quando se pensa em obter um medicamento fitoterápico. É necessário muito estudo e cuidado para a escolha da espécie que será usada. Quando se fala em padronização do extrato de plantas alguns fatores podem influenciar significativamente na qualidade, tais como as diferentes subespécies e variedades que é utilizada, a localização geográfica onde a matéria-prima está sendo cultivada, também o momento que é realizada a colheita do material e a fase do desenvolvimento em que se encontra, dentre várias outras características (FILIPPINI et al., 2010).

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estabelecer o melhor período do ano e do dia para obtenção de *Lippia alba* com maior teor de princípios ativos.

Objetivos Específicos

- Avaliar a variação sazonal e circadiana dos componentes fixos presente nas folhas de *Lippia alba*.

- Quantificar e associar as variações nos metabólitos secundários presente nas folhas de *Lippia alba*.

- Analisar a existência de influência dos fatores climáticos na produção de princípios ativos.

- Identificar a existência de uma relação na produção de princípios ativos com a idade da planta.

4 MATERIAIS E MÉTODO

Obtenção do extrato etanólico

Materiais, solventes e reagentes

O solvente para CLAE (metanol) foi obtido da JTBaker[®]. O ácido fórmico foi obtido da CRQ[®] (Diadema, Brasil). A água ultrapura foi produzida pela Milli-Qwater (millipore sas 67120 molsheim - França). O etanol 95% foi adquirido da Dinamica[®]. O acteosídeo (95%) foi obtido do HWI group[®] e os demais marcadores analíticos (ácido geneposídico, *epi*-loganina, mussaenosídeo e tricina-7-*O*-diglucuronídeo) previamente isolados por Gomes et al (2019), com pureza de 95% (CLAE) utilizando Sílica CC (Cromatografia em Coluna), Sephadex-LH20-CC e CLAE semipreparativa dos extratos.

Coleta do material vegetal

Esta pesquisa possui autorização do CGEN (010806/2015-6) e as exsicatas estão depositadas no Herbário Mongoyós do IMS-CAT-UFBA (# 1536) e no Herbário do Instituto de Biologia da UFBA (# ALCB 130052).

A coleta do material foi realizada no município de Vitória da Conquista, Bahia, Brazil (14^o 51'58' de latitude Sul e 40^o 50'22' de longitude Oeste, a uma altitude de 879,47 m acima do nível do mar). Os indivíduos de *Lippia alba* foram plantados no ano de 2013, na Universidade Federal da Bahia (UFBA), Instituto Multidisciplinar em Saúde (IMS), Campus Anísio Teixeira (CAT). Foram selecionados três indivíduos do quimiotipo limoneno-carvona e três do quimiotipo linalol-eucaliptol para o estudo em dois anos consecutivos (2018 e 2019). Em 2018 foi realizado a análise circadiana e sazonal, sendo realizado as coletas para o estudo circadiano nos meses de janeiro, abril, julho e outubro nos horários de 06h00, 10h00, 14h00, 18h00 e 22h00, totalizando 120 amostras. Para a análise sazonal foram realizadas coletas em todos os meses dos anos de 2018 e 2019 no horário de 10h00, totalizando 120 amostras.

Preparo do extrato

Os extratos hidroetanólicos de *L. alba* foram preparados utilizando-se solução hidroetanólica a 80%, por maceração das folhas frescas da planta a temperatura ambiente. Após 72 horas esses extratos foram concentrados sob pressão reduzida como auxílio de

evaporador rotativo. Este procedimento foi repetido duas vezes. O concentrado obtido foi então, armazenado em frascos de vidro devidamente identificados e levados para a estufa a 40° C para o término da secagem.

Preparo das amostras para injeção no CLAE-DAD

As amostras de cada extrato foram preparadas utilizando 20 mg de cada extrato bruto, dissolvido em 2 mL da mistura de metanol e água na proporção de 1:9, respectivamente. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao ultrassom durante 30 minutos para a solubilização das amostras. Após esse procedimento, as amostras passaram para a centrifugação a 4000 rpm durante 20 minutos. A parte solúvel de cada amostra foi filtrada em filtros com poro de 0,45 µm antes da injeção no aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Cada amostra foi injetada em triplicata.

Análise dos componentes fixos

Método analítico

Os extratos preparados foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) com metodologia previamente desenvolvida e validada (ALMEIDA et al., 2023; ARAUJO et al., 2022). As análises foram realizadas em sistema CLAE (Shimadzu LC-20AT) (DAD, desgaseificador online, bomba quaternária) e gerenciadas pelo software LCSolutions[®]. Os perfis cromatográficos foram adquiridos na faixa de comprimento de onda de 220–500 nm e registrados em 240, 254, 325 e 350 nm. A coluna utilizada foi a C-18 (Shim-pack CLC-ODS(M)[®] C18 Shimadzu), 150x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5µm, acoplado à uma pré-coluna C-18. A metodologia analítica desenvolvida apresenta os seguintes parâmetros: fluxo de 0,9 mL/min, volume de injeção de 20 µL, fase móvel constituída pelos solventes: fase orgânica metanol e fase aquosa solução de ácido fórmico a 0,9%. O modo de eluição foi em gradiente, conforme descrito na tabela 1 a seguir:

Tabela 1: Programação do gradiente para análises de extratos de *Lippia alba*

Tempo (min)	% Metanol
0	20
30	55
35	98
40	98
45	20
48	20

Análise dos componentes

Os padrões utilizados foram do ácido geneposídico, *epi*-loganina, mussaenosídeo, acteosídeo e tricina-7-*O*-diglucuronídeo. Para cada substância foi construída curvas de calibração através do preparo e injeção das soluções padrões das mesmas em concentrações crescentes. Cada solução padrão de cada composto foi injetada na metodologia descrita, em triplicata, e as áreas obtidas foram utilizadas para a construção da curva de calibração. A partir das curvas de calibração de cada composto obtivemos as respectivas equações da reta através do método de regressão linear. Essas equações foram então utilizadas para realização do cálculo das concentrações de cada substância em cada amostra dos extratos.

As curvas de calibração geradas pela plotagem da área do pico *versus* concentração foram analisadas por regressão linear. A linearidade foi acessada pela análise dos parâmetros de regressão, pela análise do gráfico de resíduos e pela análise de variância (ANOVA, com $p = 95\%$). A equação de regressão linear da curva de calibração foi utilizada para determinar o Limite de Detecção LD e o Limite de Quantificação LQ (tabela 2). Os LD e LQ foram calculados com base no desvio padrão (DP) da regressão e do coeficiente angular (ca) da curva analítica como $3,3 DP/ca$ e $10DP/ca$, respectivamente (ALMEIDA et al., 2023; ARAÚJO et al. 2022).

Tabela 2: Equação de regressão, coeficientes de correlação, faixas de linearidade, LD e LQ das substâncias bioativas investigadas

Substância	Tempo de retenção (min)	Equação de Regressão	R ²	Faixa linear (mg/ml)	LD (mg/ml)	LQ (mg/ml)
Ácido	4,4	$y = 2 \times 10^7 x + 35196$	0,9991	0,10 – 0,80	0,025	0,075
geneposídico *Epi-loganina	11,0	$y = 4 \times 10^7 x - 688068$	0,9988	0,013 – 1,54	0,006	0,017
Mussaenosídeo	13,0	$y = 4 \times 10^7 x - 688068$	0,9988	0,013 – 1,54	0,006	0,017
Acteosídeo	19,3	$y = 5 \times 10^7 x - 3 \times 10^6$	0,9941	0,10 – 1,00	0,039	0,117
Tricina-7-O-diglicuronídeo	23,0	$y = 4 \times 10^6 x$	0,9983	0,01 – 0,68	0,005	0,010

LD = Limite de detecção

LQ = Limite de quantificação

*A curva de calibração do mussaenosídeo foi utilizada para quantificação da *epi*-loganina devido à similaridade estrutural entre esses iridoides.

As áreas de cada composto presente nas amostras foram calculadas e utilizadas nas respectivas equações da reta de cada substância (Excel), a fim de obter a concentração dos padrões em cada amostra. A análise estatística das amostras foi realizada através do cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação (%) das áreas de cada pico dos padrões.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do uso do Statistical Package for the Social Science - SPSS, uma ferramenta de fácil manuseio que possibilita realizar análises estatísticas e gráficas utilizando uma grande amplitude de dados (SANTOS, 2018).

Para este estudo, inicialmente foi tabulado a média mensal da concentração de cada composto nos extratos em seu respectivo horário e inserido no software os valores das

concentrações. Em seguida foram selecionados os itens estatísticos desejados para realizar as correlações. No caso da presente pesquisa foi utilizado a correlação de Pearson, correlacionando a média da concentração dos metabólitos com os dados meteorológicos obtidos no ano da coleta das amostras. Esses dados estão apresentados na Table 1S (ano 2018/2019) e Table 2S (ano 2015) (material suplementar do artigo). Além disso, foi aplicada a Análise de Variância - ANOVA, para comparar as médias e verificar se existe diferença significativa entre os diferentes grupos (comparação das curvas de tendências com o gráfico do EXCEL®).

Para correlacionar a variação dos metabólicos secundários com as variáveis climáticas foi aplicado a correlação de Pearson nos dados dos cinco compostos estudados. Os valores obtidos após os testes estão dispostos na Table 3S (material suplementar do artigo).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S.; CARRÉ, I. A. Downstream of the plant circadian clock: output pathways for the control of physiology and development. **Essays in Biochemistry**, v. 49, p. 53–69, 30 jun. 2011.
- AGUIAR, J. S. et al. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 436–440, set. 2008.
- AGUIAR, L. K. **Importância e uso das plantas medicinais na comunidade de Morro Agudo, Araranguá (SC). Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)**. Morro Agudo, Araranguá(SC), 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ifsc.edu.br/handle/123456789/1027>>. Acesso em: 6 fev. 2024
- ALBERT, A. et al. Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. cv. ARBO. **Oecologia**, v. 160, n. 1, p. 1–8, 5 maios 2009.
- ALMEIDA, M. P. DE et al. Qualitative and quantitative chemical characterization of spray-dried extracts and the development of an innovative oral solid formulation from *Lippia alba*. **Separation Science plus**, v. 6, n. 4, 7 abr. 2023.
- AMOROZO, M. C. DE M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 2, p. 189–203, abr. 2002.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. et al. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3–4, p. 374–378, jun. 2005.
- ARAUJO, L. E. B. DE; ROCHA, M. C. A. DA. Biodiversidade brasileira: Biopirataria e a proteção dos conhecimentos tradicionais. **Direito - UFMS**, v. 4, p. 57–73, jun. 2018.
- ARAÚJO, U. S DE, GOMES, A. F, MOREIRA, B. O. **Aplicação de otimização multivariada no desenvolvimento de um procedimento de extração assistida por micro-ondas para determinação dos bioativos de *Lippia alba* usando HPLC-DAD**. Congresso IMS. Vitória da Conquista – Bahia: IMS-CAT-UFBA; 2022.
- BARROS, F. M. C. DE et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861–867, 2009.
- BOS, R. et al. Seasonal variation of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. **Planta Medica**, v. 64, n. 02, p. 143–147, 4 mar. 1998.
- BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no 26, de 13 de maio de 2014 - Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**. BRASIL, 2014. Disponível: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnpmf/orientacao-ao-prescritor/Publicacoes/resolucao-rdc-no-26-de-13-de-maio-de-2014.pdf/view>. Acesso em: 6 fev. 2024

BRUNO, S. F.; MATOS, U. A. DE O. Benefícios da biodiversidade para as comunidades tradicionais: a nova legislação os sustenta? **Ciência Florestal**, v. 31, n. 2, p. 998–1019, 1jun. 2021.

CACCIA-BAVA, M. DO C. G. G. et al. Disponibilidade de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais nas unidades de atenção básica do Estado de São Paulo: resultados do Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica (PMAQ). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 5, p. 1651–1659, maio 2017.

CAJAIBA, R. L. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais comercializadas no município de Uruará, Pará, Brasil. **Biotemas**, v. 29, n. 1, p. 115, 5 fev. 2016.

CAMILLO, F. C. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson uma espécie nativa promissora para a introdução em programas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, p. 21–27, 2016.

CRUZ, L. V. V.; SALIMENA, F. R. G. Verbenaceae J.St.-Hil. do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Bol. Bot. Univ.**, v. 35, p. 65–74, 2017.

DAELS-RAKOTOARISON, D. et al. Neurosedative and Antioxidant Activities of Phenylpropanoids from *Ballota nigra*. **Arzneimittelforschung**, v. 50, n. 01, p. 16–23, 28 dez. 2011.

DI STASI, L. C. et al. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, n. 2–3, p. 205–211, dez. 1988.

DO VALE, T. G. et al. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 709–714, jan. 2002.

DRØHSE HØGEDAL, B.; MØLGAARD, P. HPLC analysis of the seasonal and diurnal variation of iridoids in cultivars of *Antirrhinum majus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 10, p. 949–962, dez. 2000.

ELSOHLY, H. N. et al. Diurnal and seasonal effects on the Taxane content of the clippings of certain *Taxus* cultivars. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 3, p. 124–129, mai. 1997.

FÉLIX-SILVA, J. et al. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 3, p. 548–555, 2012.

FIGUEREDO, C. A. DE; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381–400, 2014.

FILIPPINI, R. et al. Study of dynamic accumulation of secondary metabolites in three subspecies of *Hypericum perforatum*. **Fitoterapia**, v. 81, n. 2, p. 115–119, mar. 2010.

FRANÇA, E. DE; VASCONCELLOS, A. G. Patentes-de-fitoterapicos-no-Brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 35, p. 329–359, dez. 2018.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627–641, dez. 2008.

GAZOLA, R. et al. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 5, p. 477–480, nov. 2004.

GLOWNIAK, K.; MROCZEK, T.; ZOBEL, A. M. Seasonal changes in the concentrations of four taxoids in *Taxus baccata* L. during the autumn-spring period. **Phytomedicine**, v. 6, n. 2, p. 135–140, mai. 1999.

GOBBO-NETO, L. et al. Differential metabolic and biological profiles of *Lychnophora ericoides* mart. (Asteraceae) from different localities in the Brazilian “campos rupestres”. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 4, p. 750–759, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, abr. 2007.

GOMES, A. F. **Nova metodologia analítica para análise qualitativa e quantitativa de metabólitos bioativos de *Lippia alba* e do seu produto fitoterápico desenvolvido. Tese (doutorado)** Salvador, 17 dez. 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufba.br/handle/ri/28186>>. Acesso em: 7 fev. 2024

GOMES, A. F. et al. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. **Food Chemistry**, v. 273, p. 186–193, fev. 2019.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64–77, 2011.

GUILHERMINO, J. DE F.; QUENTAL, C.; BOMTEMPO, J. V. Sistema de Inovação em Fitomedicamentos: Os Desafios da gestão para o desenvolvimento de Fitomedicamentos a partir da Biodiversidade Brasileira. **Revista Fitos**, p. 169–184, set. 2012.

HATANO, V. Y. et al. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 3, p. 238–243, mar. 2012.

HENNEBELLE, T. et al. Antioxidant and neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba*. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 2, p. 256–258, 17 fev. 2008.

HOOKE, I. et al. Seasonal variation of neutral and basic taxoid contents in shoots of European Yew (*Taxus baccata*). **Phytochemistry**, v. 52, n. 6, p. 1041–1045, nov. 1999.

INMET- Instituto Nacional de Meteorologia. **Dados meteorológicos de Vitória da Conquista**. 2022. Disponível: <https://portal.inmet.gov.br/>. Acesso em: fev. 2024

INOUE, K.; ARAKI, T.; ENDO, M. Circadian clock during plant development. **Journal of Plant Research**, v. 131, n. 1, p. 59–66, 13 jan. 2018.

LÓPEZ-VILLAFRANCO, M. E. et al. Las Verbenaceae empleadas como recurso herbolario en México: una revisión etnobotánica-médica The Verbenaceae used as an herbal resource in Mexico: an ethnobotanical- medical review. **Polibotánica**, v. 0, n. 44, 15 jun. 2017.

MATOS, F. J. DE A. et al. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 6, p. 695–698, nov. 1996.

MATTOS, G. et al. Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 11, p. 3735–3744, nov. 2018.

MAYNARD, L. G. et al. Chemical composition and vasorelaxant effect induced by the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (Verbenaceae) in rat mesenteric artery. **Indian journal of pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 694–8, nov. 2011.

MCWATTERS, H. G.; DEVLIN, P. F. Timing in plants – A rhythmic arrangement. **FEBS Letters**, v. 585, n. 10, p. 1474–1484, 20 maio 2011.

NONATO, C. DE F. A. et al. Antibacterial activity and anxiolytic effect in adult Zebrafish of Genus *Lippia* L. Species. **Plants**, v. 12, n. 8, p. 1675, 17 abr. 2023.

OLIVEIRA, G. T. DE 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, 19 mar. 2018.

OSHIRO, M. C. et al. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 4, n. 4, 25 nov. 2016.

PASCUAL, M. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **II Farmaco**, v. 56, n. 5–7, p. 501–504, 1 jul. 2001.

PAVARINI, D. P. et al. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1–4, p. 5–16, set. 2012.

PEREIRA, J. B. A. et al. O papel terapêutico do Programa Farmácia Viva e das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 550–561, dez. 2015.

PIMENTEL, V. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, p. 41–89, jun. 2015.

PORFÍRIO, E. M. et al. *In Vitro* antibacterial and antibiofilm activity of *Lippia alba* essential oil, citral, and carvone against *Staphylococcus aureus*. **The Scientific World Journal**, v. 2017, p. 1–7, 2017.

RÊGO, A. G. S.; REIS, L. C. DE M.; SILVA, F. L. DA. Fitomedicamentos utilizados na medicina popular e suas potencialidades pouco exploradas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e189101623017, 11 dez. 2021.

ROCA-PÉREZ, L. et al. Seasonal cardenolide production and Dop5 β r gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p. 1869–1878, jul. 2004.

SALIMENA, F.R.G.; O'LEARY, N.; CARDOSO, P.H.; SCHAEFER, J.; SILVA, T.R.D.S.; MORONI, P.; SILVA, G.B.; THODE, V.A.; BOLDORINI, A. *Verbenaceae in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB246>>. Acesso em: 1 mai. 2024

SANTOS, A. **IBM SPSS como ferramenta de pesquisa quantitativa**. São Paulo - PUC, 2018. Disponível em: <<https://www.pucsp.br/sites/default/files/download/posgraduacao/programas/administracao/IBM-SPSS-como-ferramenta%20de-pesquisa-quantitativa-alexandra-santos.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2024

SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils. (Falsa-Melissa) Verbenaceae**. Dissertação(mestrado). Florianópolis, 2001. Disponível em: <<http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/80021>>. Acesso em: 7 fev. 2024

SOUSA, S. M. DE. **Contribuições à biosistemática do gênero *Lippia* L. (Verbenaceae)**. Tese (doutorado). Lavras, 2008. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/3881>>. Acesso em: 7 fev. 2024

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, maio 2015.

TULER, A. C. **Levantamento etnobotânico na comunidade rural de São José da Figueira, Durandé, MG, Brasil**. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Alegre, 2011.

VANCE, N. C.; KELSEY, R. G.; SABIN, T. E. Seasonal and tissue variation in taxane concentrations of *Taxus brevifolia*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 5, p. 1241–1244, ago. 1994.

VESELÁ, D. et al. Seasonal variations in the content of taxanes in the bark of *Taxus baccata* L. **Phytochemical Analysis**, v. 10, n. 6, p. 319–321, nov. 1999.

VIANA, G. S. B. et al. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: A Comparative Study. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n. 5, p. 347–351, 29 jan. 1998.

ZÉTOLA, M. et al. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba*—Verbenaceae (Brazilian false melissa). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 2–3, p. 207–215, out. 2002.

CAPÍTULO 1

Seasonal and circadian variation of non-volatile metabolites in *Lippia alba* leaves.

Girlane Oliveira Rocha^a, Caroline Scabini^a, Jayne Ferreira da Silva Oliveira^a, Déborah Neres Oliveira^a, Luise Carvalho Mota^a, Brenda Novais Almeida Neves^a, Amanda Menezes dos Santos^a, Flávio Mendes de Souza^a, Urias Santos de Araújo^a, Bruno Oliveira Moreira^{a,c}, Maiara Prates de Almeida^a, Juliano Geraldo Amaral^{a,c}, Jorge Maurício David^b, Angélica Ferraz Gomes^{a,c*}

^a Instituto Multidisciplinar em Saúde. Universidade Federal da Bahia, 45029-094, Vitória da Conquista - Bahia – Brazil.

^b Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, 40170-280, Salvador – BA, Brazil

^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Energia e Ambiente – INCT E&A, Universidade Federal da Bahia, 40170-115, Salvador- BA, Brazil

(*e-mail: licaferraz@yahoo.com.br)

Abstract

The present study describes the seasonal and circadian variations of the major compounds from *Lippia alba* leaves. SPSS was used to identify, quantify, and associate the variations in the secondary metabolites of this species through HPLC/DAD analysis of the leaves hydroethanolic extracts of six selected *L. alba* specimens. For the circadian study, the samples were collected at four different daily hours in each year's season. For the seasonal study, the samples were collected monthly from the same individuals for two consecutive years (2018 and 2019). These samples were analyzed and quantified using a validated HPLC method for flavonoids, iridoids, and phenyl ethanoid glycoside. Mussaenoside, acteoside, and triclin-7-*O*-diglucuronide showed a moderate positive correlation between their biosynthesis and the precipitation index, while *epi*-loganin had a moderate negative correlation. Acteoside showed a moderate positive correlation between the minimum registered temperature and its production. Compared with previous studies, a drastic reduction (about 95%) in the production of triclin-7-*O*-diglucuronide compared with previous study and this difference could be attributed to the plant's aging. Thus, the data demonstrated that lower temperatures and high rainfall could favor the production of the major *L. alba* active compounds (acteoside and triclin-7-*O*-diglucuronide) and that older plants harm their production.

Keywords: acteoside, Iridoids, liquid chromatography, natural products, rainfall, temperature, triclin-7-*O*-diglucuronide.

Introduction

Several factors influenced specialized metabolite production, such as temperature, altitude, humidity, rainfall, ultraviolet radiation, soil and nutrient conditions, seasonality, and the circadian cycle.^[1] However, studies on the influence of these factors on secondary metabolite production have been conducted predominantly in many marketable species from temperate regions worldwide.^[2-4] *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. Ex Britton & P. Wilson (Verbenaceae) (Fig. 1) has presented several pharmacological evidence of its anxiolytic effect for treating insomnia. It is native to America and occurs spontaneously in Brazil in the Atlantic Forest. Unlike most species currently used for these disorders it is an accessible species to handle and cultivate.^[5-7] In previous studies, acteoside (Fig. 2, 4) was suggested to be a chemical marker of the species, and the results of the Prediction of Activity Spectra for Substances pointed it to a possible anxiolytic action.^[8] Consequently, this species could be a promising medicinal plant for obtaining herbal medicine for treating insomnia and anxiety symptoms. Thus, knowledge of the seasonal behavior in the metabolite production of medicinal species is a strategic element for obtaining adequate and standardized vegetable raw materials to obtain a quality herbal product meeting safety and efficacy requirements. Because of the scarcity of data about seasonality and circadian rhythms variables, intending to optimize the cultivation of this species, this study describes the identification and quantification of *L. alba*'s main compounds (Fig. 2) in order to associate the seasonal and circadian variation of this species with supporting the development of herbal medicine. This work describes a seasonal and circadian phytochemical study of the non-volatile compounds of *Lippia alba* to obtain the raw material from this species with higher levels of bioactive compounds, focusing on the acteoside, due to its anxiety properties.^[8,9]



Figure 1: Image of *L. alba* cultivated at UFBA

Figure 2 illustrates the phytochemical structures of the compounds investigated in this study.

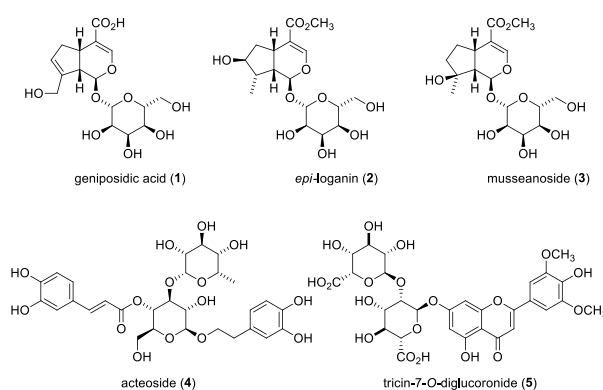


Figure 2: Main non-volatile compounds present in *L. alba* species

Results and Discussion

Phytochemical composition

The chemotype carvone-limonene of *L. alba* presented the five main compounds (Figure 2). However, the linalool chemotype presented only geneposidic acid (1), acteoside (4), and tricin-7-O-diglucuronide (5) (Supplementary Material, Table 5S). Figure 3 shows the representative HPLC of the extracts with the main peaks detected for compounds 1-5. The chromatogram shows the extract reaches compounds absorbing in the selected wavelength and corroborates 1-5 are metabolites representatives of this

chemotype.

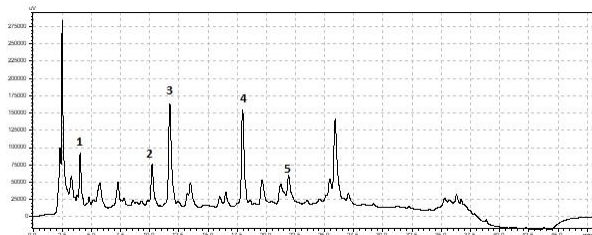


Figure 3. Chromatogram of compounds identified by HPLC-DAD (254 nm) of the carvone-limonene chemotype.: **1**-geneposidic acid, **2**-*epi*-loganin, **3**-mussaenoside, **4**-acteoside, **5**-tricin-7-*O*-diglucuronide.

Climatic factor interference

According to the National Institute of Meteorology (INMET), Vitória da Conquista (BA)-Brazil presents a tropical climate of altitude in which it has mild and dry winters (temperature around 18 °C) and relatively hot and rainy summers. Meteorological data show that the total precipitation index had a reduction of 37.6% from 2018 to 2019, and the temperature fluctuated between months, being higher in some months in 2019 (Support Information Material, Tables 1S and 2S).^[10,11]

The described compounds were quantified in all prepared hydroethanolic extracts after validation of the parameters (Support Information, Table 4S). The relative yield of each compound is expressed in Figures 4-9. Pearson's correlation coefficient was employed to establish the variation in the detected and quantified metabolites with climatic variables. The following values were used as reference: 0.10 - 0.29 as low, 0.30 - 0.49 as moderate, and values ≥ 0.50 , high correlation. In 2018, there was a moderate positive correlation between the maximum temperature and the production of geneposidic acid ($r=0.329$) and mussaenoside ($r=0.382$). However, there was a moderate positive correlation between the minimum temperature and the production of acteoside ($r=0.404$) and tricin-7-*O*-diglucuronide ($r=0.397$).

It is well-established that low-temperature

stress is one of the most critical limiting factors for plant productivity and distribution worldwide. Chilling injury is associated with changes in membrane properties, such as solute leakage, reduced transport across the plasma membranes, malfunction of the mitochondria respiration, inhibition of photosynthetic activities, and induction of active oxygen species.^[12] However, in previous studies, some metabolites show a positive relationship with low temperatures, such as artemisin in *Artemisia spp.*, anthocyanins in *Nicotiana tabacum* and *Malus sp.*, and phenolic metabolites in *Arnica montana*. The production of these metabolites would be a defense response to the high levels of active oxygen species formed during lower temperatures.^[13-16] The high production of acteoside and tricin-7-*O*-diglucuronide under low temperatures as a protection mechanism may explain the moderate positive correlation observed for acteoside and tricin-7-*O*-diglucuronide under these conditions. Because these substances are the main components of this species, it can be inferred that low temperatures are advantageous for this species in obtaining vegetable raw material with a higher content of active ingredients.

Regarding precipitation, in 2018, there was a high positive correlation for acteoside ($r=0.674$) and tricin-7-*O*-diglucuronide ($r=0.713$) and a moderate negative correlation for *epi*-loganin production ($r= - 0.441$).

Concerning 2019, there was a moderate negative correlation between the lowest temperatures and the production of *epi*-loganin ($r= -0.355$) and mussaenoside ($r= -0.304$). Acteoside ($r=0.412$) and *epi*-loganin ($r=0.428$) showed a moderate positive correlation with precipitation. These results are presented in the Supplementary Material (Table 3S). Figures 4 and 5 show the relationship between precipitation and acteoside and tricin-7-*O*-diglucuronide biosynthesis in *L. alba* during 2018 - 2019.

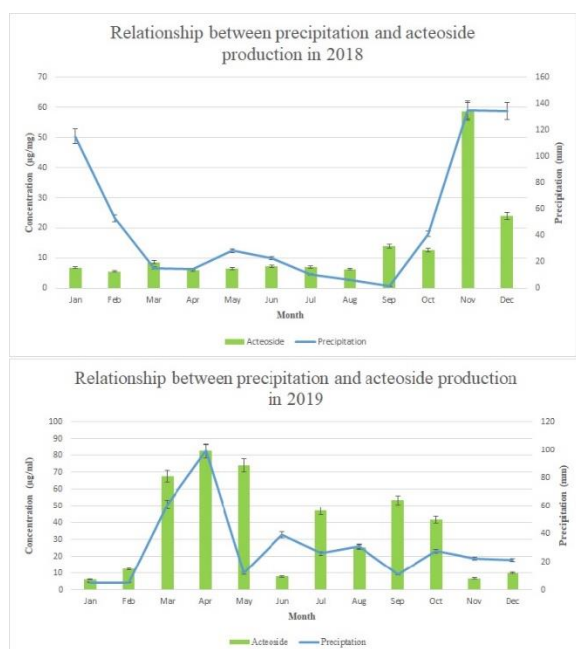


Figure 4: Local precipitation and acteoside yields in 2018 and 2019.

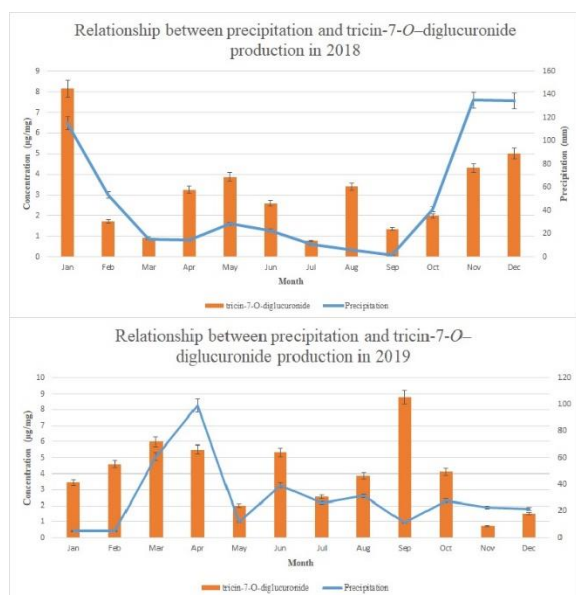


Figure 5: Local precipitation and tricin-7-O-diglucuronide yields in 2018 and 2019.

Circadian rhythm

Higher production of mussaenoside and *epi*-loganin occurs between 6 pm and 10 pm and tricin-7-O-diglucuronide at 10 am and 10 pm, and during the summer season (Fig. 6). These results indicate a positive relationship between lower temperatures during this period and the production of these

compounds, once in this region during these months the temperature range from 15 to 32 °C.

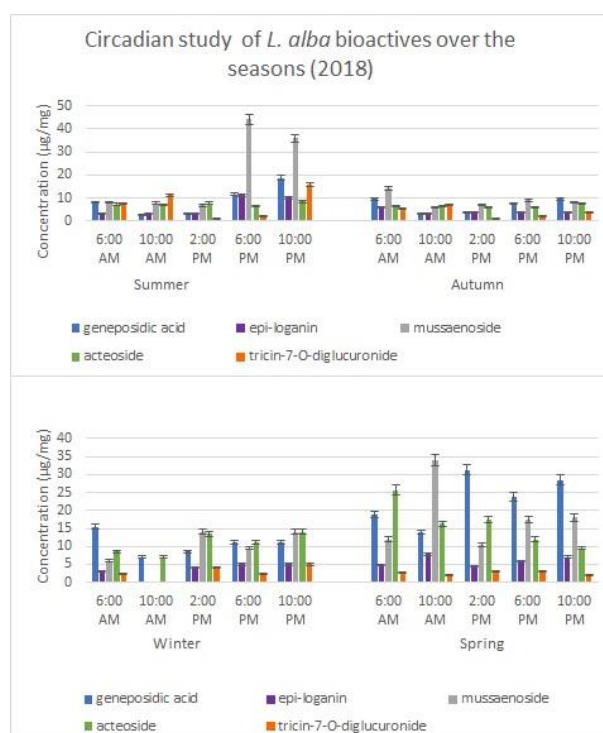


Figure 6. Effect of circadian variation in the species *Lippia alba*.

Previous studies dealing with the seasonal and circadian behavior of some of the previously investigated bioactive metabolites indicated these variations were detected for flavonoids and caffeoylquinic acids present in *Lychnophora ericoides* leaves. The highest concentrations of flavonoids are found in the early evening (9 pm) during the summer (rain season), and caffeoylquinic acids in the afternoon (12 pm to 6 pm) during the winter (dry season and mild temperatures).^[17] In another study, iridoid content in *Antirrhinum majus* also varies during the day. Although the variation is substantial, no pattern was observed.^[18]

Seasonal variation

For this kind of variation, a comparison of the obtained data (2018 and 2019 in this study) and previous results of 2015 was carried out.^[19,20] We investigated the same population of these species to verify the existence of

patterns in the production of the compounds over the years (Fig. 7).

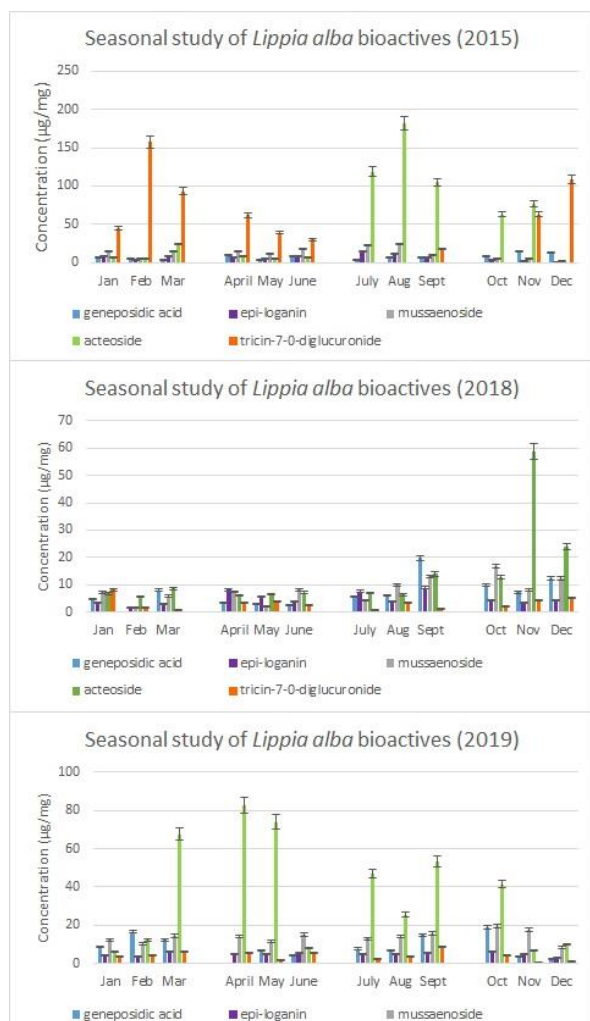


Figure 7: Seasonal study of *Lippia alba* bioactive carried out in 2015^[20], 2018 and 2019

With the main objective of establishing the best season of year and day period for harvesting the species with the highest acteoside production. Given the results obtained, until now, it is not possible to establish a pattern for acteoside production. One hypothesis to justify this result is the significant difference in rain precipitation between 2018 and 2019. The Person's correlation evaluation demonstrated a high positive correlation between rain precipitation and the production of acteoside and triclin-7-O-digluconide (Support Information, Table 3S). Possibly, the rainfall reduction impacted the production of these metabolites and,

consequently, the lack of reproducibility of their production in different years.

In studies that aim to determine the seasonality of taxoids, with paclitaxel as the primary target, changes in the concentration of these compounds in *Taxus brevifolia* and *T. baccata* are observed throughout the year. However, it was not feasible to determine a pattern of the observed variation due to conflicting results in the literature.^[21–25] In the study with *Gentiana lutea*, the metabolites can vary depending on the plant development stage. In the flowering phase, the leaves are rich in compounds with C-glycoside structures (mangiferin and isoorientin), whereas the O-glycoside structures (isoentisin-primeveroside and isogentisin) mainly accumulate before flowering.^[26] Another similar study could not relate iridoid variation in *Antirrhinum majus* to changes in abiotic conditions such as temperature, insolation, humidity, or nutrient availability.^[18]

However, plant age seems to impact acteoside and triclin-7-O-digluconide production (Fig. 8). The latter showed a significant reduction from 2015 to 2019 (> 90%). In this aspect, the results corroborate those previously found in the species *Lychnophora ericoides*. There was a pronounced reduction in the contents of all secondary metabolites in *Lychnophora ericoides* on older leaves. This reduction was more intense for chlorogenic acids and flavonoids.^[17] The seasonal study carried out with the *Daucus carota* species also identified that flavonoid concentrations are higher in the tissues of new leaves or new spring foliage.^[27] In the leaves of *Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae), the older plants showed concentrations of aucubin, catapol, total iridoid glycosides, and nitrogen approximately one-half that of plants harvested 6 weeks earlier.^[28]

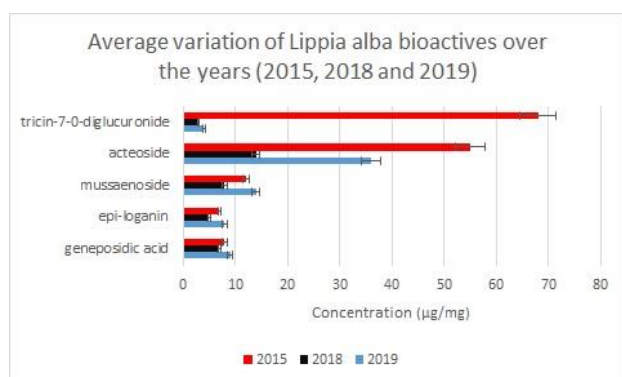


Figure 8: *L. alba* phytochemical variation in 2015, 2018, and 2019

Due to the significant difference in rainfall between 2018 and 2019, the data was insufficient to correctly establish the appropriate season for collecting this species. That is why phytomedicines and natural products are associated with variability in plant metabolite levels, which can impact the safety and reliability of these products. Thus, the best practice is their cultivation in a controlled environment with favorable geographical and climatic conditions to produce homogeneous phytoconstituents. Other possible variations are the differences in soil quality and methods of cultivated medicinal plants for secondary metabolite extraction. Such consequences result in discrepancies in yield reproducibility and extractive composition of bioactive phytometabolites from the same medicinal plant species. Thus, the patient may not obtain uniform and optimized bioactivity from the same herbal formulations from different batches.^[15,29]

Because of the results obtained, we concluded that other factors should be investigated to determine which would have the highest impact on acteoside production. In the present study, we demonstrated that lower temperatures and high rainfall could favor the production of the major *L. alba* active compounds (acteoside and triclin-7-O-digluconide) and that older plants harm their production.

Conclusion

Despite the lack of reproducibility in acteoside production over the years, this study provided new information showing the influence of temperature, the plant collection period, and the impact of plant age on the biosynthesis of the main non-volatile metabolites of *Lippia alba*. These data are relevant for its cultivation with higher levels of bioactives. Knowledge of seasonal and circadian variation and other abiotic factors in plant bioactive production is a relevant strategy to obtain better quality herbal products. The variation in the production of bioactive from plant species is a challenging issue for extract standardization of phytomedicines.

Experimental Section

Plant material, cultivation of seedlings, and leaf extraction

The plant was cultivated at the Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista city and the respective voucher specimens are deposited at the Herbarium Mongoyós of the same university under (# 1536). The authors have the authorization of access to the Genetic Heritage Management Council with the number code AAFC3B. Plant seedlings of *L. alba* linalool-eucalyptol and carvone-limonene chemotypes had been planted in 2013 and three individuals of each chemotype were selected to conduct the seasonal and circadian studies. Leaf samples of these individuals were obtained monthly from January 2018 to December 2019 (seasonal study) (120 samples). For the circadian study, we collected the leaves of the same individuals at 6 am, 10 am, 2 pm, 6 pm, and 10 pm (120 samples) in the four seasons in 2018. The extracts were prepared using fresh leaves with 80% aqueous ethanol as solvent using the maceration method at room temperature. After 72 h, the filtrate was evaporated using a rotary evaporator under reduced pressure at $40 \pm 5^\circ\text{C}$ and sequentially accurately weighting the residue; this procedure was repeated

twice. The extracts were redissolved in MeOH-H₂O solution (1:9) to a final concentration of 10 mg ml⁻¹ and sonicated for 15 minutes at room temperature. These solutions were centrifuged at 4000 rpm for 20 min, and then the supernatant portions were filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter (Minisart, Sartorius, Göttingen, Germany) before HPLC analysis.

Chemicals Standard Solutions

Solvent for HPLC (methanol) was obtained from JTBaker[®]. Formic acid was obtained from CRQ[®] (Diadema, Brazil). Ultrapure water was produced by Milli-Qwater (millipore sas 67120 molsheim - France). Ethanol 95% was purchased from Dinamica[®]. Acteoside (95%) was obtained from HWI group[®] and the remaining analytical markers (geneposidic acid, 8-*epi*-loganin, mussaenoside, and tricinin-7-*O*-diglucuronide) previously isolated by Gomes *et al* [20] with a purity of 95% (HPLC) using Silica CC (Column Chromatography), Sephadex-LH20-CC and, semi-preparative HPLC from the extracts.

HPLC-DAD analysis

These samples were analyzed using the validated HPLC method [8,30]. The analyses were performed on an HPLC system (Shimadzu LC-20AT) (DAD, online degasser, quaternary pump) and managed by the software LCSolutions[®]. Chromatographic profiles were acquired in the wavelength range of 220–500 nm and were registered at 240, 254, 325, and 350 nm. The chromatographic separation occurred on a Shim-pack CLC-ODS(M)[®] C18 Shimadzu (5 µm, 150 mm x 4.6 mm), using 0.9% acetic acid (phase A) and MeOH (phase B) as the mobile phase, with a flow rate of 0.9 ml/min and 20 µl of sample were injected. The gradient started with 8:2 (A: B), with solvent B progressively increasing to 55% at 30 and 98% at 35 min; the stop time was 48 min. A post time of 5 min for each run was performed. This procedure was performed in triplicate. Table 4S (Supplementary material) presents the

method's validation parameters after the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – ICH Harmonised Tripartite Guideline. [31]

Statistical analysis

The analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences – SPSS (Version 27, 2020), an easy-to-use tool that can analyze a large amount of data. For this, the monthly average of each compound was made at its respective time, and the concentration values were entered into the software. Finally, the desired statistical items are selected, which, in the case of this research, used Pearson's correlation (correlation between meteorological data and the production of metabolites) and ANOVA (comparison of trend curves with the EXCEL[®] graph).

Acknowledgment

We want to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), CAPES, CNPq, and Permanecer- UFBA for providing scholarships and INCT for financial support.

Author Contribution Statement

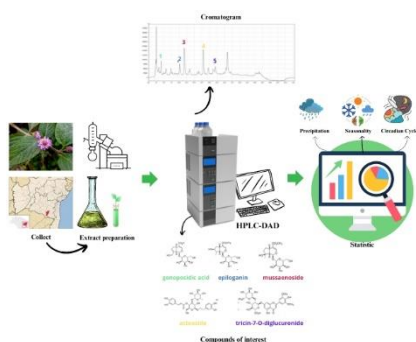
Girlane Oliveira Rocha, Deborah Neres Oliveira, and Maiara Prates de Almeida cultivated the plants and collected and prepared the extracts. Urias Santos de Araújo and Bruno Oliveira Moreira constructed the calibration curves. Girlane Oliveira Rocha, Flávio Mendes de Souza, Caroline Scabini, and Brenda Novais Almeida Neves conducted the HPLC analyses. Jayne Ferreira da Silva Oliveira, Luise Carvalho Mota, and Amanda Menezes dos Santos performed the statistical analyses and constructed the graphs. Angélica Ferraz Gomes, Juliano Geraldo Amaral and Jorge Maurício David supervised the research and wrote the article.

References

- [1] L. Gobbo-neto, N. P. Lopes, *Quim. Nova* **2007**, *30*, 374–381.
- [2] R. Bos, H. J. Woerdenbag, F. M. S. Van Putten, H. Hendriks, J. J. C. Scheffer, *Planta Med.* **1998**, *64*, 143–147.
- [3] R. Filippini, A. Piovan, A. Borsarini, R. Caniato, *Fitoterapia* **2010**, *81*, 115–119.
- [4] L. Roca-Pérez, R. Boluda, I. Gavidia, P. Pérez-Bermúdez, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1869–1878.
- [5] T. Hennebelle, S. Sahpaz, H. Joseph, F. Bailleul, *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *116*, 211–222.
- [6] J. B. A. Pereira, M. M. Rodrigues, I. R. Morais, C. R. S. Vieira, J. P. M. Sampaio, M. G. Moura, M. F. M. Damasceno, J. N. Silva, I. B. F. Calou, F. A. Deus, A. P. Peron, M. C. Abreu, G. C. G. Militão, P. M. P. Ferreira, *Rev. Bras. Plantas Med.* **2015**, *17*, 550–561.
- [7] M. Zétola, T. C. M. Lima, D. Sonaglio, G. González-Ortega, R. P. Limberger, P. R. Petrovick, V. L. Bassani, *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *82*, 207–215.
- [8] M. P. de Almeida, L. A. de O. Silva, L. A. Zimmermann, L. S. C. Bernardes, M. A. da Silva, G. A. da Silva, J. G. Amaral, A. F. Gomes, M. F. Leite, *Sep. Sci. Plus* **2023**, *6*, 1–10.
- [9] Gomes, Angélica Ferraz, M. P. Almeida, André Luís Morais Ruela, Amaral, Juliano Geraldo, M. F. L. Jorge Mauricio David, *J. Herb. Med.* **2021**, *28*, 100459.
- [10] R. S. Conceição, L. B. Pereira, A. J. P. Veiga, *Rev. Eletrônica Georaguia* **2016**, *6*, 71–83.
- [11] INMET, “Instituto Nacional de Meteorologia,” can be found under <https://www.cptec.inpe.br/previsao-tempo/ba/vitoria-da-conquista>, **2023**.
- [12] S. Yoshida, *J. Plant Res.* **1999**, *112*, 223–224.
- [13] A. Albert, V. Sareedenchai, W. Heller, H. K. Seidlitz, C. Zidorn, *Oecologia* **2009**, *160*, 1–8.
- [14] Z. A. Huang, T. Zhao, H. J. Fan, N. Wang, S. S. Zheng, H. Q. Ling, *J. Genet. Genomics* **2012**, *39*, 149–156.
- [15] D. P. Pavarini, S. P. Pavarini, M. Niehues, N. P. Lopes, *Anim. Feed Sci. Technol.* **2012**, *176*, 5–16.
- [16] T. E. Wallaart, N. Pras, A. C. Beekman, W. J. Quax, **1999**, 57–62.
- [17] L. Gobbo-Neto, Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora Ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais, Universidade de São Paulo, **2007**.
- [18] D. B. Høgedal, P. Mølgaard, *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, *28*, 949–962.
- [19] A. F. Gomes, M. Ganzera, S. Schwaiger, H. Stuppner, M. Halabalaki, M. P. Almeida, M. F. Leite, J. G. Amaral, J. M. David, *Microchem. J.* **2018**, *138*, 494–500.
- [20] A. F. Gomes, M. P. Almeida, M. F. Leite, S. Schwaiger, H. Stuppner, M. Halabalaki, J. G. Amaral, J. M. David, *Food Chem.* **2019**, *273*, 186–193.
- [21] H. N. Elsohly, E. M. Croom, W. J. Kopycki, A. S. Joshi, J. D. McChesney, *Phytochem. Anal.* **1997**, *8*, 124–129.
- [22] K. Glowniak, T. Mroczek, A. M. Zobel, *Phytomedicine* **1999**, *6*, 135–140.
- [23] I. Hook, C. Poupat, A. Ahond, D. Guénard, F. Guéritte, M. T. Adeline, X. P. Wang, D. Dempsey, S. Breuillet, P. Potier, *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1041–1045.
- [24] N. C. Vance, R. G. Kelsey, T. E. Sabin, *Phytochemistry* **1994**, *36*, 1241–1244.
- [25] D. Veselá, D. Šaman, I. Valterová, T. Vaněk, *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 319–321.
- [26] N. Menković, K. Šavikin-Fodulović, K. Savin, *Planta Med.* **2000**, *66*, 178–180.
- [27] J. S. Brooks, P. Feeny, *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 769–782.
- [28] M. D. Bowers, N. E. Stamp, *Ecology* **1993**, *74*, 1778–1791.

- [29] P. Palit, S. C. Mandal, in *Evid. Based Valid. Tradit. Med.* (Ed.: Springer), Springer, Singapore, **2021**, pp. 359–369.
- [30] U. S. de Araújo, A. F. Gomes, B. O. Moreira, *Congr. IMS* **2022**.
- [31] ICH, *Int. Conf. Harmon. Tech. Requir. Regist. Pharm. Hum. Use* **2005**, 1–13.

Graphical abstract



The graphical abstract displays the phytochemical composition of the primary metabolites under study, demonstrating their respective structures and chromatograms. In addition, we emphasize the key factors that influenced the production of these substances and the techniques used to conduct this research.

Support Information

Seasonal and circadian variation of non-volatile metabolites in *Lippia alba* leaves.

Girlane Oliveira Rocha ^a, Caroline Scabini ^a, Jayne Ferreira da Silva Oliveira ^a, Deborah Neres Oliveira ^a, Luise Carvalho Mota ^a, Brenda Novais Almeida Neves ^a, Amanda Menezes dos Santos ^a, Flávio Mendes de Souza ^a, Urias Santos de Araújo^a, Bruno Oliveira Moreira^{a,c}, Maiara Prates de Almeida ^a, Juliano Geraldo Amaral ^{a, c}, Jorge Mauricio David ^b, Angélica Ferraz Gomes ^{a,c*}

^a Instituto Multidisciplinar em Saúde. Universidade Federal da Bahia, 45029-094, Vitória da Conquista - Bahia – Brazil.

^b Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, 40170-280, Salvador – BA, Brazil

^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Energia e Ambiente – INCT E&A, Universidade Federal da Bahia, 40170-115, Salvador- BA, Brazil
(e-mail: licaferraz@yahoo.com.br)

Table 1S: Climate data from the municipality of Vitória da Conquista-BA in 2018 and 2019. Source: INMET (2023). ^[1]

Month	Maximum temperature (°C)		Minimum temperature (°C)		Accumulated rainfall (mm)	
	2018	2019	2018	2019	2018	2019
January	32.4	31.2	14.9	15.2	115.2	5.0
February	30.7	32.2	15.5	19.7	53.2	5.0
March	32.5	34.4	14.4	15.9	15.4	60.8
April	29.4	30.3	15.7	15.3	14.4	99.2
May	29.8	30.3	14.4	15.0	28.4	11.8
June	28.2	28.8	11.8	12.6	22.8	39.4
July	25.8	30.5	10.7	9.8	10.6	26.0
August	29.9	26.7	11.1	12.3	6.2	31.2
September	31.6	30.8	12.1	11.0	1.6	10.8
October	32.5	32.9	13.9	14.1	41.2	27.8
November	28.9	33.7	16.6	15.4	135.0	22.6
December	30.4	35.2	14.4	14.8	134.4	21.6

Table 2S: Climate data from the municipality of Vitória da Conquista-BA in 2015. Source: INMET (2023). ^[1]

Month	Maximum temperature (°C)	Minimum temperature (°C)	Accumulated rainfall (mm)
Year 2015			
January	30.2	13.4	7.4
February	30.7	12.0	103.0
March	31.1	8.0	55.5
April	33.1	14.0	55.3
May	29.2	11.6	28.7
June	29.7	8.5	34.4
July	29.1	8.0	22.1
August	26.8	7.4	43.8
September	33.7	11.6	0.0
October	33.7	11.8	23.9
November	34.5	13.8	55.0
December	34.7	14.0	56.1

[1] INMET, “Instituto Nacional de Meteorologia.,” <https://www.cptec.inpe.br/previsao-tempo/ba/vitoria-da-conquista>, **2023**.

Table 3S: Pearson correlation coefficients (r) of the major components of *L. alba* and climate data from the municipality of Vitória da Conquista-BA in 2018 and 2019.

Substances	Maximum temperature (°C)	Minimum temperature (°C)	Precipitation (mm)
Year 2018			
Geneposidic acid	0.329	- 0.224	0.027
<i>Epi</i> -loganin	- 0.311	- 0.318	- 0.441
Mussaenoside	0.382	- 0.168	0.112
Acteoside	- 0.109	0.404	0.674*
Tricin-7- <i>O</i> -diglicuronide	0.217	0.397	0.713*
Year 2019			
Geneposidic acid	0.078	0.241	0.099
<i>Epi</i> -loganin	- 0.187	- 0.355	0.412
Mussaenoside	- 0.085	- 0.304	0.211
Acteoside	- 0.121	- 0.221	0.428
Tricin-7- <i>O</i> -diglicuronide	- 0.240	- 0.161	0.261

p = -1 Means a negative correlation between the two variables

p = 0 It means that the two variables do not depend linearly on each other.

*Values indicate a strong correlation.

For all data, $\alpha = 0.05$ was adopted p = 1 Means a positive correlation between the two variables.

Table 4S- Regression equation, correlation coefficients, linearity ranges, LOD, and LOQ of the investigated bioactive substances.

Substance	Retention time (min)	Equation	R ²	Calibration range (mg ml ⁻¹)	LOD (mg ml ⁻¹)	LOQ (mg ml ⁻¹)	RSD (%)
Geneposidic acid	4.4	$y = 2 \times 10^7 x + 35196$	0.9991	0.10 – 0.80	0.025	0.075	1.82
* <i>Epi</i> -loganin	11.0	$y = 4 \times 10^7 x - 688068$	0.9988	0.013 – 1.54	0.006	0.017	1.95
Mussaenoside	13.0	$y = 4 \times 10^7 x - 688068$	0.9988	0.013 – 1.54	0.006	0.017	1.95
Acteoside	19.3	$y = 5 \times 10^7 x - 3 \times 10^6$	0.9941	0.10 – 1.00	0.039	0.117	2.39
Tricin-7- <i>O</i> -diglicuronide	23.0	$y = 4 \times 10^6 x$	0.9983	0.01 – 0.68	0.005	0.010	1.73

LOD = Limit of detection

LOQ = Limit of quantification

* The mussaenoside calibration curve was used for *epi*-loganin quantification due to the structural similarity between these iridoids

Table 5S- Main constituents identified in the study of the leaves of two chemotypes of *Lippia alba*.

Peak	Retention time (min)	Substances
Chemotype carvone-limonene		
1	4.4	Geneposidic acid
2	11.0	<i>Epi</i> -loganin
3	13.0	Mussaenoside
4	19.3	Acteoside
5	23.0	Tricin-7- <i>O</i> -diglicuronide
Chemotype linalool-eucalyptol		
1	4.4	Geneposidic acid
2	19.3	Acteoside
3	23.2	Tricin-7- <i>O</i> -diglicuronide

Anexo - Normas para publicação na revista Chemistry & Biodiversity

O artigo científico deve ser escrito com os elementos na ordem a seguir:

- Página de título: Contendo (título, autores e autores correspondentes, departamento e/ou instituições, endereço, e-mail e dedicatória);
 - Resumo: O resumo deve ser escrito com limite máximo de 150 palavras;
 - Palavras-chave: deve conter entre 3 e 7 palavras-chave;
 - Introdução;
 - Resultados e discussão;
 - Conclusão;
 - Secção experimental: (Procedimentos/dados experimentais essenciais. (Os dados de caracterização de novos compostos isolados devem ser fornecidos na Seção Experimental. Todos os outros dados de caracterização, espectros originais, etc., devem ser fornecidos nas Informações de Apoio.)
 - Material Suplementar (opcional);
 - Agradecimentos (opcional);
 - Declaração de contribuição dos autores (obrigatório para publicação);
 - Referências (não deve exceder 60 referências);
 - Esquemas;
 - Figuras: (Observação: não combine figura e legenda em uma caixa de texto ou quadro)
 - Tabelas: (Observação: não inclua a tabela em uma caixa de texto ou quadro);
 - Graphical abstract: **(É obrigatório para a publicação) no formato paisagem com uma proporção de largura máx.: 11,0 cm altura máx.: 7,0 cm. A imagem deve fornecer uma ideia clara acerca do conteúdo do artigo. Se possível, forneça nomes de usuário do Twitter do instituto e/ou pesquisador.**
- Instruções sobre como incluir uma figura, esquema ou tabela com largura de coluna dupla:
- Ajuste as dimensões dos gráficos para representação de uma ou duas colunas. Para figuras de uma coluna a largura deverá ser de 8,19 cm, com resolução de 600 dpi, para gráficos de duas colunas deverá ter largura de 17,0 cm, com resolução de 600 dpi.
 - O número total máximo de figuras e esquemas juntos não deve exceder 8.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi possível demonstrar que temperaturas mais baixas e precipitações elevadas podem favorecer o aumento da produção dos principais compostos ativos de *Lippia alba* (acteosídeo e tricina- 7-O- diglucuronídeo).
- A idade da planta também influenciou na produção dos compostos. Foi identificado que em plantas mais velhas de *Lippia alba* a produção dos compostos (acteosídeo e tricina- 7-O- diglucuronídeo) podem cair drasticamente.
- Apesar de não conseguir observar um padrão estável de produção do acteosídeo ao longo dos anos, esta pesquisa forneceu informações inéditas sobre a interferência de fatores como a temperatura e a precipitação na biossíntese dos principais metabólitos não voláteis de *Lippia alba*.
- O vegetal depende de inúmeros fatores e condições para seu crescimento, desenvolvimento e reprodução. Desta maneira, o conhecimento dos impactos da variação sazonal e circadiana dentre outros fatores abióticos na produção da matéria-prima vegetal se tornam bastante relevantes, principalmente, por auxiliar nas melhores tomadas de decisão para obter um produto final de qualidade.