

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

LUAN DA ROSA SILVA

**ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon citratus* Stapf.) APRESENTA
AÇÃO INSETICIDA E SEDATIVA E CAUSA INIBIÇÃO DE
ACETILCOLINESTERASE EM *Drosophila melanogaster* Meigen**

**São Gabriel, RS
2025**

LUAN DA ROSA SILVA

**ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon citratus* Stapf.) APRESENTA
AÇÃO INSETICIDA E SEDATIVA E CAUSA INIBIÇÃO DE
ACETILCOLINESTERASE EM *Drosophila melanogaster* Meigen**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thaís Posser

Coorientador: Dr. Mauro Eugênio Medina Nunes

**São Gabriel, RS
2025**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S5860 Silva, Luan da Rosa
ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (Cymbopogon citratus Stapf.)
APRESENTA AÇÃO INSETICIDA E SEDATIVA E CAUSA INIBIÇÃO DE
ACETILCOLINESTERASE EM *Drosophila melanogaster* Meigen / Luan
da Rosa Silva.

53 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2025.

"Orientação: Thais Posser".

1. Óleo essencial. 2. Capim-limão. 3. Mosca-da-fruta. 4.
Produtos naturais. 5. Inseticida. I. Título.

LUAN DA ROSA SILVA

**ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon citratus* Stapf.) APRESENTA
AÇÃO INSETICIDA, SEDATIVA E CAUSA INIBIÇÃO DE
ACETILCOLINESTERASE EM *Drosophila melanogaster* Meigen**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Qualidade Ambiental

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: 05 de setembro de 2025.

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Thais Posser
Orientadora
UNIPAMPA

Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Helena do Canto Vinadé
UNIPAMPA

Prof. Dr. Pablo Echeverria Macedo
UNOPAR

Dedico este trabalho a quem, de alguma forma, ajudou a viabilizá-lo e a quem ele, ocasionalmente, possa ser útil.

AGRADECIMENTO

À minha família, meus amigos de longa e curta data e colegas por, cada um ao seu modo, ter me dado suporte material, emocional e técnico durante essa jornada. Também à professora Thais Posser e ao Grupo de Pesquisa pelas oportunidades e conhecimentos adquiridos.

“Dosis sola facit venenum.”

Paracelso

RESUMO

Os óleos essenciais (OEs) representam alternativas promissoras aos pesticidas sintéticos, oferecendo propriedades bioativas com menor impacto ambiental. Este estudo investigou os efeitos biológicos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e componentes isolados em *Drosophila melanogaster*, avaliando suas propriedades inseticidas, sedativas e anticolinesterásicas *in vivo* e *in vitro*. Os componentes utilizados, geraniol, mirceno e linalol, foram escolhidos com base em estudo cromatográfico do óleo. Primeiramente, foi feita uma curva de dose, onde moscas adultas foram expostas ao OE nas doses de 0,25 μL , 0,5 μL e 1 μL por 1 hora por fumigação e depois transferidas para tubos sem a presença do óleo, para verificar a mortalidade efetiva, onde permaneceram por 3 horas. A taxa de moscas ativas reduziu significativamente após 50 minutos em 0,25 μL , 40 minutos em 0,5 μL , e 30 minutos em 1 μL , havendo uma recuperação de 100% em 0,25 μL , 60% em 0,5 μL , e 30% em 1 μL , sendo a última configurada como dose de trabalho. Então, na dose de 1 μL , as moscas foram expostas por 25 minutos com tempo de recuperação de 2 horas, onde pode ser observada uma queda no número de moscas ativas para 5% após 25 minutos, com retorno de 76% após 2 horas de cessada a exposição. A atividade da enzima acetilcolinesterase foi medida *in vitro*, demonstrando redução significativa em relação ao controle, e *in vivo*, onde se observou redução significativa da atividade enzimática após recuperação de 2 horas em relação ao controle. Os componentes geraniol, mirceno e linalol foram testados individualmente e em coexposições onde, no primeiro cenário, somente o linalol demonstrou efeito sedativo significativo após 1 hora com recuperação de 64% após 2 horas, e no segundo cenário, onde as moscas coexpostas com geraniol e linalol e ao mirceno e o linalol demonstraram sedação total após 1 hora com recuperação de 5% e 37% respectivamente, as coexpostas ao mirceno e ao geraniol houve apenas 20% de sedação, não sendo feita a recuperação destas. Os resultados do presente estudo apontam que o OE apresenta efeito dose e tempo dependente, inibe parcialmente a ação da acetilcolinesterase e um componente que pode estar relacionado ao efeito sedativo é o linalol, em sinergia com outros componentes. Com isso, o OE é um candidato promissor a inseticida natural contra a mosca-da-fruta, o que leva o estudo ao encontro dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável 3 e 12 da ONU que visam a redução do uso de pesticidas sintéticos e, com isto, de doenças acarretadas por estes.

Palavras-chave: óleo essencial, capim-limão, mosca-da-fruta, produtos naturais, inseticida.

ABSTRACT

Essential oils (EOs) represent promising alternatives to synthetic pesticides, offering bioactive properties with less environmental impact. This study investigated the biological effects of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) essential oil and isolated components on *Drosophila melanogaster*, evaluating their insecticidal, sedative, and anticholinesterase properties in vivo and in vitro. The components used, geraniol, myrcene, and linalool, were chosen based on a chromatographic study of the oil. First, a dose curve was made, where adult flies were exposed to EO at doses of 0.25 μL , 0.5 μL , and 1 μL for 1 hour by fumigation and then transferred to tubes without the presence of oil to verify effective mortality, where they remained for 3 hours. The rate of active flies decreased significantly after 50 minutes at 0.25 μL , 40 minutes at 0.5 μL , and 30 minutes at 1 μL , with a recovery of 100% at 0.25 μL , 60% at 0.5 μL , and 30% at 1 μL , the latter being set as the working dose. Then, at a dose of 1 μL , the flies were exposed for 25 minutes with a recovery time of 2 hours, where a drop in the number of active flies to 5% could be observed after 25 minutes, with a return of 76% after 2 hours of cessation of exposure. Acetylcholinesterase enzyme activity was measured in vitro, showing a significant reduction compared to the control, and in vivo, where a significant reduction in enzyme activity was observed after 2 hours of recovery compared to the control. The components geraniol, myrcene, and linalool were tested individually and in co-exposures where, in the first scenario, only linalool showed a significant sedative effect after 1 hour with 64% recovery after 2 hours, and in the second scenario, where flies coexposed to geraniol and linalool and to myrcene and linalool showed total sedation after 1 hour with recovery of 5% and 37%, respectively, those coexposed to myrcene and geraniol showed only 20% sedation, with no recovery. The results of this study indicate that EO has a dose- and time-dependent effect, partially inhibits the action of acetylcholinesterase, and that a component that may be related to the sedative effect is linalool, in synergy with other components. Thus, EO is a promising candidate for a natural pesticide against fruit flies, which brings the study in line with the UN Sustainable Development Goals 3 and 12, which aim to reduce the use of synthetic pesticides and, with this, the diseases caused by them.

Keywords: essential oil, lemongrass, fruit-fly, natural products, insecticide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de terpenos encontrados em óleos essenciais	17
Figura 2 – Capim-limão (<i>C. citratus</i>)	20
Figura 3 – Fórmula estrutural da acetilcolina	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

AFNOR - Association Française de Normalisation

ANOVA - Analysis of Variance (Análise de Variância)

C10 - 10 Carbonos (monoterpenos)

C15 - 15 Carbonos (sesquiterpenos)

C20 - 20 Carbonos (diterpenos)

ChAT - Colina acetiltransferase

COX-2 - Ciclooxygenase-2

CP - Chlorpirifos (Clorpirifós)

CTL - Control (Controle)

DMSO - Dimetilsulfóxido

GABA - Gamma-Aminobutyric Acid (Ácido Gama-Aminobutírico)

GC-MS - Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas)

IC50 - Concentração Inibitória de 50%

MEP - Metileritritol fosfato

ODS - Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

OE - Óleo Essencial

ONU - Organização das Nações Unidas

SD - Standard Diet (Dieta Padrão)

SDGs - Sustainable Development Goals (Objetivos de Desenvolvimento Sustentável)

SEM - Standard Error of the Mean (Erro Padrão da Média)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Óleos Essenciais.....	17
2.2	<i>Cymbopogon citratus</i>	19
2.3	Sistema Colinérgico.....	21
2.4	<i>Drosophila melanogaster</i>	23
3	OBJETIVOS.....	25
4	MANUSCRITO.....	26
5	CONCLUSÕES.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

APRESENTAÇÃO

A estrutura deste estudo compreende a **INTRODUÇÃO**, que estabelece o panorama do assunto; a **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, que apresenta o conhecimento atual sobre o tema; os **OBJETIVOS**, que delimitam a investigação; o **MANUSCRITO**, com a metodologia, resultados e análises no formato que foi submetido à revista Journal of Essential Oil Research; e as **CONCLUSÕES**, que resumem os achados principais.

1 INTRODUÇÃO

Óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis produzidos pelo metabolismo secundário das plantas ¹. Esses compostos, majoritariamente terpenos e fenilpropanóides, desempenham papéis cruciais para a sobrevivência vegetal, atuando na defesa contra herbívoros e patógenos, e na atração de polinizadores ¹. A composição química de um óleo essencial pode variar significativamente dependendo de fatores como espécie da planta, condições de cultivo e método de extração, o que influencia diretamente suas propriedades biológicas ². Devido à sua vasta gama de atividades farmacológicas, incluindo ações antimicrobiana, anti-inflamatória e inseticida, os óleos essenciais têm sido amplamente explorados em diversas aplicações comerciais, desde a indústria farmacêutica e de cosméticos até a agricultura ^{1,3}.

Desde a Idade Média, os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados por suas propriedades bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitárias, inseticidas, medicinais e cosméticas, especialmente nas indústrias farmacêutica, sanitária, cosmética, agrícola e alimentícia ¹. Devido ao modo de extração, principalmente por destilação de plantas aromáticas, eles contêm uma variedade de moléculas voláteis como terpenos e terpenóides, componentes aromáticos derivados de fenol e componentes alifáticos. Atualmente, aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes, especialmente para as indústrias farmacêutica, agrônômica, alimentícia, sanitária, cosmética e de perfumes ¹.

Estes compostos naturais representam misturas complexas que podem conter cerca de 20-60 componentes em concentrações bastante diferentes, caracterizados por dois ou três componentes principais em concentrações relativamente altas (20-70%) comparados a outros componentes presentes em quantidades traço ¹. Por exemplo, carvacrol (30%) e timol (27%) são os componentes principais do óleo essencial de *Origanum compactum*, linalol (68%) do óleo essencial de *Coriandrum sativum*, α - e β -tujona (57%) e cânfora (24%) do óleo essencial de *Artemisia herba-alba*, 1,8-cineol (50%) do óleo essencial de *Cinnamomum camphora*, e mentol (59%) e mentona (19%) do óleo essencial de *Mentha piperita* ¹.

Os monoterpenos de óleos essenciais têm demonstrado produzir sedação ou letalidade em uma ampla gama de animais. A exposição prolongada ao citral ou limoneno produziu letalidade em moscas domésticas, sendo que tanto o citral quanto o limoneno foram letais para mosquitos ⁴. O citral também produziu sedação em caracóis e camundongos, demonstrando sua versatilidade como composto bioativo ⁴. Muitos óleos essenciais de plantas

mostram um amplo espectro de atividade contra insetos-praga e fungos fitopatogênicos, variando desde atividades inseticidas, anti alimentares, repelentes, deterrentes de oviposição, reguladoras de crescimento e anti vetoriais ³. Estes óleos também têm uma longa tradição de uso na proteção de produtos armazenados, representando alternativas ecologicamente sustentáveis aos pesticidas sintéticos ³.

Dentro deste contexto, o óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), uma planta da família Poaceae, destaca-se por sua rica composição em citral (uma mistura dos isômeros geranial e neral), que é o principal responsável por suas notáveis atividades biológicas ^{5,6}. Estudos têm demonstrado o potencial do óleo de *C. citratus* como inseticida e larvicida contra diversos vetores, incluindo *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* ^{7,8}.

Investigações recentes indicam que alguns constituintes químicos destes óleos interferem com o sistema nervoso octopaminérgico em insetos. Como este sítio alvo não é compartilhado com mamíferos, a maioria dos químicos de óleos essenciais são relativamente não-tóxicos para mamíferos e peixes em testes toxicológicos, atendendo aos critérios para pesticidas de "risco reduzido" ³. Alguns destes óleos e seus constituintes químicos são amplamente utilizados como agentes aromatizantes em alimentos e bebidas, sendo até mesmo isentos de registro como pesticidas. Este status regulatório especial, combinado com a ampla disponibilidade de óleos essenciais das indústrias de sabor e fragrância, tornou possível acelerar a comercialização de pesticidas baseados em óleos essenciais ³. Além disso, enquanto o desenvolvimento de resistência continua sendo uma questão para muitos pesticidas sintéticos, é provável que a resistência se desenvolva mais lentamente para pesticidas baseados em óleos essenciais devido às misturas complexas de constituintes que caracterizam muitos destes óleos ³.

A acetilcolinesterase (AChE) é vital para a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, e sua inibição leva à paralisia e morte do inseto ⁹. A inibição da enzima acetilcolinesterase é um mecanismo de ação observado em compostos inseticidas sintéticos como organofosforados, contribuindo para o mecanismo de ação destes compostos. A ação inseticida de óleos essenciais tem sido amplamente demonstrada em diversos estudos ^{1,3,10}. A participação da enzima acetilcolinesterase nos mecanismos de ação dos óleos essenciais foi demonstrada por Rants'o et al. ¹⁰, que identificaram compostos de óleos essenciais com potencial anticolinesterásico contra vetores *Anopheles*, e por Távora et al. ⁸, que demonstraram que geraniol e linalol do óleo de *C. citratus* são eficazes inibidores da acetilcolinesterase através de estudos de docking molecular.

A mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, é um organismo modelo extensivamente utilizado em pesquisas biomédicas devido a seu rápido ciclo de vida, baixo custo de manutenção e, crucialmente, por apresentar homologia genética significativa com humanos, incluindo genes relacionados a doenças neurodegenerativas e vias metabólicas¹¹. A utilização de *D. melanogaster* para avaliar o potencial biológico e toxicológico de substâncias naturais e sintéticas, como os pesticidas, tem sido considerada uma abordagem consolidada que permite investigações detalhadas sobre os mecanismos de ação em nível molecular e fisiológico^{12,13}.

A busca por inseticidas de origem natural, como o óleo de *C. citratus*, alinha-se diretamente com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU. Especificamente, esta pesquisa contribui para o ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), ao desenvolver alternativas mais seguras e de base natural para o controle de vetores de doenças e para o desenvolvimento de novos compostos com potencial anestésico. Adicionalmente, o estudo apoia o ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis), ao promover o uso de recursos naturais renováveis e biodegradáveis em detrimento de pesticidas sintéticos, que frequentemente causam contaminação ambiental e riscos à saúde humana.

Assim, este trabalho investiga os efeitos do óleo essencial de *C. citratus* sobre o comportamento da mosca da fruta *D. melanogaster*, avaliando seu potencial como anestésico, inseticida e sua ação frente à enzima acetilcolinesterase *in vivo* e *in vitro*, visando fornecer uma base científica para o desenvolvimento de produtos mais seguros e sustentáveis que conciliem eficácia biológica com sustentabilidade ambiental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais representam uma classe fascinante de metabólitos secundários vegetais que têm despertado crescente interesse científico devido às suas propriedades biológicas diversificadas e potencial terapêutico. Segundo a definição estabelecida pela Association Française de Normalisation (AFNOR), os óleos essenciais constituem produtos obtidos de matérias-primas vegetais por destilação com água ou vapor d'água, ou por processos mecânicos a partir do epicarpo de frutos cítricos, sendo posteriormente separados da fase aquosa por processos físicos ¹. Esta definição técnica ressalta a importância dos métodos de extração na qualidade e composição final destes produtos naturais.

A complexidade química dos óleos essenciais deriva de sua natureza como misturas complexas de compostos voláteis, predominantemente constituídos por terpenos e seus derivados oxigenados. Dhifi et al. ² destacam que estes compostos incluem monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅) e diterpenos (C₂₀), além de compostos aromáticos derivados do fenilpropano (Figura 1). A variabilidade na composição química dos óleos essenciais é influenciada por múltiplos fatores, incluindo a espécie vegetal, condições climáticas, época de colheita, método de extração e armazenamento ².

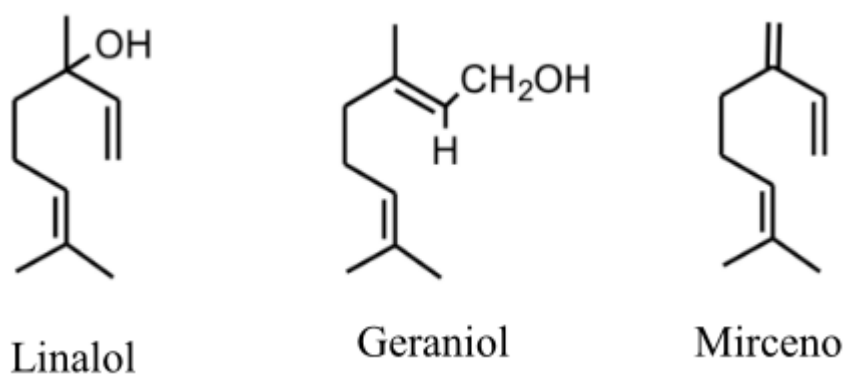


Figura 1: Exemplos de terpenos encontrados em óleos essenciais

Fonte: Imagens extraídas e adaptadas de Koul et al, 2008.

Do ponto de vista biossintético, os óleos essenciais são produzidos através de duas vias metabólicas principais: a via do mevalonato, que ocorre no citoplasma, e a via do

metileritritol fosfato (MEP), localizada nos plastídios ¹⁴. Estas vias biossintéticas são responsáveis pela formação dos precursores isoprênicos que darão origem à diversidade estrutural observada nos óleos essenciais. A compreensão destes processos biossintéticos tem implicações importantes para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento vegetal e otimização da produção de compostos bioativos.

A localização dos óleos essenciais nas plantas varia consideravelmente entre as espécies, sendo encontrados em estruturas especializadas como tricomas glandulares, canais secretores, células oleíferas e bolsas lisígenas ¹⁵. Esta diversidade anatômica reflete adaptações evolutivas específicas e influencia diretamente os métodos de extração mais adequados para cada espécie vegetal. Bakkali et al. ¹ enfatizam que a localização anatômica dos óleos essenciais está intimamente relacionada com suas funções ecológicas, incluindo proteção contra herbívoros, atração de polinizadores e defesa antimicrobiana.

As propriedades físico-químicas dos óleos essenciais são características distintivas que determinam sua aplicabilidade em diferentes setores industriais. Geralmente apresentam-se como líquidos voláteis à temperatura ambiente, com densidade inferior à da água, índice de refração elevado e atividade óptica variável ¹⁶. A volatilidade destes compostos é uma propriedade fundamental que permite sua utilização em aromaterapia e como agentes flavorizantes, enquanto sua lipofilicidade facilita a penetração através de membranas biológicas.

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais ao nível celular e molecular têm sido progressivamente elucidados através de estudos *in vitro* e *in vivo*. A interação com membranas celulares representa um dos principais alvos de ação, onde os componentes lipofílicos dos óleos essenciais podem alterar a fluidez e permeabilidade das membranas, resultando em perda da integridade celular ¹⁷.

Da Silva et al. ⁴ realizaram um estudo pioneiro sobre os efeitos comportamentais e fisiológicos do óleo essencial de *Lippia alba* em *Drosophila melanogaster*, demonstrando que a exposição aos vapores do óleo essencial resultou em imobilização dos insetos adultos. A análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massas identificou o citral (59%), carvona (7%) e limoneno (7%) como os componentes majoritários. Os autores observaram que a imobilização foi principalmente atribuída ao citral e à carvona, com o citral produzindo efeitos mais rápidos. Significativamente, o estudo demonstrou que o óleo essencial, aplicado a 0,012% (v/v), produziu uma redução superior a 50% na amplitude dos potenciais pós-sinápticos excitatórios dentro de 3-4 minutos, evidenciando interferência direta na transmissão sináptica.

Um aspecto particularmente interessante dos óleos essenciais é sua capacidade de inibição da acetilcolinesterase, enzima-chave no sistema nervoso central responsável pela hidrólise da acetilcolina. Esta característica elenca óleos essenciais, como de *Curcuma longa* e *Salvia officinalis*, como potenciais alternativas de inseticidas naturais anticolinesterásicos frente às contrapartes sintéticas, como piretróides, com risco reduzido de desenvolvimento de resistência ¹⁰.

2.2 *Cymbopogon citratus*

O *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, popularmente conhecido como capim-limão, capim-santo ou erva-cidreira, representa uma das espécies vegetais mais significativas da família Poaceae, subfamília Panicoideae, amplamente reconhecida por suas propriedades medicinais e aromáticas excepcionais. Esta gramínea perene, originária das regiões tropicais da Ásia, particularmente da Índia e Sri Lanka, tem sido extensivamente cultivada e naturalizada em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo América do Sul, África e Oceania ¹⁸.

A distribuição geográfica atual do *C. citratus* reflete tanto sua adaptabilidade ecológica quanto sua importância econômica e medicinal. No Brasil, a espécie encontra-se amplamente distribuída, sendo cultivada desde a região amazônica até o sul do país, adaptando-se às diferentes condições climáticas e edáficas ¹⁹. Esta ampla distribuição geográfica tem contribuído para o desenvolvimento de diferentes quimiotipos, ou seja, variações na composição química do óleo essencial em função da origem geográfica e condições ambientais de cultivo.

Do ponto de vista botânico, o *C. citratus* caracteriza-se como uma planta herbácea perene, formando touceiras densas que podem atingir até 1,5 metros de altura. As folhas são lineares, estreitas, com bordas cortantes e apresentam coloração verde-azulada característica (Figura 2). A inflorescência, quando presente, manifesta-se como uma panícula terminal, embora a reprodução vegetativa seja predominante na espécie ²⁰. A ausência frequente de floração em condições de cultivo tem implicações importantes para a propagação da espécie, que ocorre principalmente através da divisão de touceiras.



Figura 2: Capim-limão (*C. citratus*)

Fonte: GBIF autor Christian Marty

A composição química do óleo essencial de *C. citratus* tem sido objeto de extensos estudos fitoquímicos, revelando uma complexidade molecular notável que varia significativamente em função de múltiplos fatores. Shah et al.⁵ conduziram uma análise abrangente da composição química, identificando o citral como o componente majoritário, representando tipicamente 65-85% da composição total do óleo essencial. O citral, na realidade, constitui uma mistura isomérica de dois aldeídos monoterpênicos: o geranial (citral a) e o neral (citral b), em proporções que variam entre 2:1 e 3:1, respectivamente.

Além do citral, outros componentes significativos incluem o mirceno (12-25%), geraniol (2-5%), citronelal (2-4%), geranil acetato (1-3%) e linalol (1-2%)²¹. Esta composição química complexa é responsável pelas propriedades organolépticas características da espécie, incluindo o aroma cítrico intenso e as propriedades biológicas diversificadas. A variabilidade na composição química tem levado ao reconhecimento de diferentes quimiotipos de *C. citratus*, classificados principalmente com base na concentração relativa de citral e outros componentes majoritários.

A etnofarmacologia do *C. citratus* revela uma rica tradição de uso medicinal que transcende fronteiras geográficas e culturais. Na medicina tradicional brasileira, a espécie é amplamente utilizada como chá para o tratamento de distúrbios digestivos, ansiedade, insônia

e hipertensão arterial ²². Na medicina ayurvédica indiana, o capim-limão é empregado no tratamento de febre, dores articulares e infecções respiratórias. Na medicina tradicional africana, particularmente na região subsaariana, a espécie é utilizada como antipirético, analgésico e no tratamento de malária ²³.

As atividades farmacológicas do *C. citratus* têm sido extensivamente investigadas através de estudos in vitro, in vivo e clínicos, revelando um espectro amplo de propriedades biológicas. A atividade anti-inflamatória, uma das mais bem documentadas, tem sido demonstrada tanto por via oral quanto tópica. Boukhatem et al. ²⁴ investigaram os mecanismos anti-inflamatórios do óleo essencial, demonstrando inibição significativa da produção de mediadores inflamatórios o citral, componente majoritário, apresentou inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) comparável a anti-inflamatórios não esteroidais convencionais. A atividade antifúngica do *C. citratus* tem demonstrado eficácia contra uma ampla gama de fungos patogênicos, incluindo espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* e dermatófitos ²⁵. O mecanismo antifúngico parece envolver a desestabilização da membrana celular fúngica e inibição de enzimas essenciais do metabolismo fúngico.

Os efeitos neurocomportamentais e sedativos do *C. citratus* representam uma área de crescente interesse científico, particularmente relevante para o presente estudo. Investigações utilizando modelos animais têm demonstrado que o óleo essencial de capim-limão produz efeitos sedativos, ansiolíticos e anticonvulsivantes significativos ²⁶. Em estudos com camundongos, a administração do óleo essencial por via inalatória resultou em redução significativa da atividade locomotora, aumento do tempo de sono e diminuição de comportamentos relacionados à ansiedade em testes comportamentais padronizados.

2.3 Sistema Colinérgico

O sistema colinérgico representa um dos sistemas neurotransmissores mais fundamentais e evolutivamente conservados do reino animal, desempenhando papéis cruciais tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico. Este sistema neurotransmissor, caracterizado pela utilização da acetilcolina (ACh) como principal mediador químico (Figura 3), está envolvido em uma ampla gama de funções fisiológicas, incluindo controle motor, processos cognitivos, regulação autonômica e modulação comportamental ²⁷.

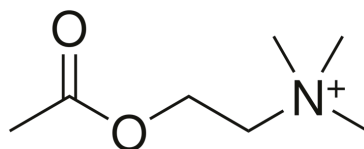


Figura 3: Fórmula estrutural da acetilcolina.

Fonte: Wikipédia

A acetilcolina, descoberta por Otto Loewi em 1921 como a primeira substância neurotransmissora identificada, é sintetizada através da reação enzimática catalisada pela colina acetiltransferase (ChAT), que utiliza colina e acetil-coenzima A como substratos. Esta reação ocorre no terminal pré-sináptico dos neurônios colinérgicos, onde a ACh é subsequentemente armazenada em vesículas sinápticas especializadas ²⁸. A síntese de acetilcolina é um processo altamente regulado que depende da disponibilidade de substratos, atividade enzimática da ChAT e demanda funcional do sistema nervoso.

A acetilcolinesterase (AChE) constitui uma das enzimas mais eficientes conhecidas na natureza, responsável pela hidrólise rápida da acetilcolina em colina e acetato, terminando assim a transmissão colinérgica. Cummins-Beebe et al. ⁹ conduziram uma revisão abrangente sobre os mecanismos colinérgicos de melhoria cognitiva, destacando que a AChE apresenta uma velocidade catalítica próxima ao limite de difusão, hidrolisando aproximadamente 25.000 moléculas de ACh por segundo. Esta eficiência catalítica extraordinária é essencial para a terminação precisa e rápida da transmissão sináptica colinérgica.

Os receptores colinérgicos são classificados em duas categorias principais baseadas em sua farmacologia e estrutura molecular: receptores nicotínicos e receptores muscarínicos. Os receptores nicotínicos são canais iônicos ligante-dependentes que mediam respostas sinápticas rápidas, enquanto os receptores muscarínicos são receptores acoplados à proteína G que modulam respostas mais lentas e duradouras ²⁹. Esta diversidade de receptores permite ao sistema colinérgico exercer efeitos funcionais distintos em diferentes contextos fisiológicos.

A toxicidade por organofosforados representa uma das principais ameaças ao sistema colinérgico, com implicações significativas para a saúde humana e animal. Estes compostos, amplamente utilizados como pesticidas e agentes de guerra química, exercem sua toxicidade através da inibição irreversível da acetilcolinesterase, resultando no acúmulo de acetilcolina nas sinapses colinérgicas ³⁰. Philyaw et al. ³¹ investigaram os efeitos de psicoestimulantes em

Drosophila, fornecendo insights sobre como diferentes compostos podem afetar a neurotransmissão e comportamento, incluindo potenciais interações com o sistema colinérgico.

2.4 *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster*, comumente conhecida como mosca-da-fruta, representa um dos organismos modelo mais valiosos e amplamente utilizados na pesquisa biomédica contemporânea. Esta pequena mosca da família Drosophilidae tem servido como sistema experimental fundamental por mais de um século, contribuindo para descobertas revolucionárias em genética, biologia do desenvolvimento, neurobiologia e medicina translacional ³². A versatilidade excepcional deste modelo experimental deriva de uma combinação única de características que incluem ciclo de vida curto, facilidade de manutenção, genética bem caracterizada e conservação evolutiva significativa com sistemas biológicos humanos.

As características genômicas da *D. melanogaster* revelam uma conservação evolutiva notável com o genoma humano, tornando-a um modelo experimental excepcionalmente relevante para estudos biomédicos. Atoki et al. ¹¹ conduziram uma revisão abrangente sobre a versatilidade da *D. melanogaster* como organismo modelo, destacando que mais de 65-70% dos genes associados a doenças humanas possuem homólogos funcionais em *Drosophila*. Esta conservação genética extraordinária permite que descobertas realizadas em moscas sejam frequentemente traduzidas para aplicações biomédicas em humanos, estabelecendo uma ponte crucial entre pesquisa básica e medicina translacional. O genoma da *D. melanogaster*, sequenciado completamente em 2000, compreende aproximadamente 140 milhões de pares de bases distribuídos em quatro cromossomos principais (X, 2, 3 e 4), codificando cerca de 14.000 genes ³³. Esta complexidade genômica relativamente modesta, comparada aos 3 bilhões de pares de bases do genoma humano, facilita análises genéticas detalhadas enquanto mantém relevância biológica significativa.

As aplicações da *D. melanogaster* em estudos de neurotoxicidade têm se expandido significativamente nas últimas décadas, aproveitando a conservação evolutiva dos mecanismos básicos de neurotransmissão e a facilidade de manipulação experimental. Lopez-Ortiz et al. ³⁴ investigaram o uso de *D. melanogaster* como sistema modelo translacional para explorar o impacto de fitoquímicos na saúde humana, demonstrando como este modelo pode ser utilizado para avaliar efeitos neuroprotetores e neurotóxicos de

compostos naturais. O estudo destacou a relevância particular deste modelo para investigações de compostos bioativos derivados de plantas, incluindo óleos essenciais e seus componentes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Avaliar os efeitos biológicos do óleo essencial de capim-limão e seus constituintes em moscas-da-fruta da espécie *Drosophila melanogaster*.

3.2 Objetivos Específicos:

- Definir a concentração experimental do óleo essencial de capim-limão, observando seus impactos na locomoção e sobrevivência das moscas;
- Analisar a resposta das moscas à dose em função do tempo;
- Verificar a reversibilidade dos efeitos na atividade das moscas após a exposição;
- Medir a atividade da acetilcolinesterase tanto após exposição *in vivo* como *in vitro* para identificar potencial inibição enzimática;
- Comparar a atividade da enzima acetilcolinesterase após a exposição e após o período de recuperação;
- Avaliar os efeitos de componentes isolados do óleo essencial.

4 MANUSCRITO

Assessing the effects of *Cymbopogon citratus* essential oil fumigation on behavior and Acetylcholinesterase activity in *Drosophila melanogaster*

Luan da Rosa Silva¹, Mauro Eugênio Medina Nunes¹, Maria Vitória Takemura Mariano¹, Jeferson Luis Franco¹, Thaís Posser^{1*}.

¹*Oxidative Stress and Cell Signaling Research Group, Federal University of Pampa, Campus São Gabriel, 97307-020 São Gabriel, RS, Brazil;*

***Corresponding author:**

Thaís Posser

Universidade Federal do Pampa

Rua Aluizio Barros Macedo, BR 290, Km 423

Prédio Acadêmico II, Lab 003

Bairro Pirai

São Gabriel - RS, Brazil

CEP: 97307-020

ABSTRACT

Essential oils represent promising alternatives to synthetic pesticides, offering bioactive properties with reduced environmental impact. This study investigated the effects of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) essential oil on *Drosophila melanogaster*, assessing mortality, motility, and acetylcholinesterase activity *in vivo* and *in vitro* as markers of insecticidal action. The essential oil of *C. citratus*, characterized by a predominance of citral, induced immobility in a time- and concentration-dependent manner, demonstrating both insecticidal and sedative effects. In addition, the oil inhibited acetylcholinesterase activity. When tested individually, linalool—a component of the oil—exerted a sedative effect by inducing transient immobility in flies, whereas geraniol and myrcene did not alter behavior. In conclusion, lemongrass essential oil exhibits bioinsecticidal activity, representing a sustainable alternative to synthetic pesticides, and highlights *C. citratus* as a valuable source of bioactive compounds with potential applications in diverse fields.

Keywords: essential oil, lemongrass, fruit-fly, natural products, insecticide.

1. INTRODUCTION

Essential oils comprise a complex mixture of volatile organic compounds produced by secondary metabolism of plants ¹. Essential oils are majoritarily composed of terpenes and phenylpropanoids, displaying essential role in vegetal survival, acting in plant defence against herbivores and pathogens, and in attraction of pollinizers ².

Chemical composition of essential oil depends on factors such as plant species, growing conditions and extraction methods that significantly influences its biological properties ³. Due to the wide range of pharmacological activities including antimicrobial, anti-inflammatory and insecticidal action, essential oils have been widely explored in several commercial applications since the pharmaceutical and cosmetic industry until in the agriculture ^{1,4}.

Among essential oil stands out the lemongrass (*Cymbopogon citratus*), a plant that belongs to the Poaceae family, that demonstrates a high concentration of citral (a mixture of isomeres of geranial and neral) that have been implicated in its biological activity^{5,6}. Studies have shown the potential of *C. citratus* essential oil as an insecticide and larvicide for controlling of *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*^{7,8}, important vectors of tropical diseases. The insecticidal action has been the focus of research of many studies due to the contribution in areas of health in controlling the spreading of insects involved with tropical diseases, mainly in developing countries and contribution in organic agriculture as an alternative for synthetic insecticides. The biological activity of essential oils have been attributed to its constituents monoterpenes, insects like houseflies and mosquitos have been shown to be susceptible to citral and/or limonene^{9,10,11}.

The *Drosophila melanogaster* fruit fly is a well-established model organism extensively used in biomedical, genetic, and pharmacological research. Its increasing application is attributed to several advantages, including a short life cycle, low maintenance cost, and high genetic homology with humans, particularly genes associated with neurodegenerative and metabolic diseases¹². In toxicological studies, *D. melanogaster* has proven valuable for evaluating the biological and toxicological potential of both synthetic and natural substances^{13,14}.

Acetylcholinesterase (AChE) is an essential enzyme responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine, and its inhibition results in insect paralysis and death¹⁵. Synthetic insecticides, such as organophosphates, act primarily through AChE inhibition. Similarly, the insecticidal activity of AChE is shown to be modulated by EOs and their constituents, such as linalool.

The search for natural substances with insecticidal potential is consistent with the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs). In particular, this study contributes to SDG 12 (Responsible consumption and production), specifically the point 12.4¹⁶. The main objective of this work was to investigate the effects of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) essential oil on the behavior and survival of *D. melanogaster*, while also evaluating its effects on AChE activity. By doing so, this study aims to provide a scientific basis for the development of safer, plant-based alternatives for insect control.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals

Essential oil was commercially obtained from Legee Aromas, Brazil. Geraniol, myrcene and linalool were acquired from Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brazil). All other reagents were commercial products of the highest purity grade available.

2.2. Flies

The stocks of the *Drosophila melanogaster* (Harwich strain) were obtained from our own breeding. The flies stocks were maintained at a constant temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ on 12 h light/dark cycle and 50%–60% relative humidity. The standard diet (SD) was composed of 10 mL standard medium mixture of 39% coarse and 32% medium corn flour, 10% wheat germ, 14% sugar, 2% milk powder, 1% sodium chloride, 1% soybean flour, 1% rye flour, 0.02% of methylparaben and 0.02% of lyophilized yeast. Subsequently, adult flies aged from 1 to 4 days of life were separated by gender and the female flies were transferred to treatment tubes (50 mm \times 85 mm) for exposure to essential oil and used in behavioral and biochemical analysis.

2.3. Essential oil

Essential oil of *C. citratus* (Legeé Aromas, Brazil) was used in different volumes (0,25 μL , 0,5 μL , and 1 μL). Essential oil was stored at room temperature and protected from light to prevent degradation. Plants were harvested in April 2024. Extraction was carried out by steam distillation and the oil was chemically profiled using GC-MS. Chromatography charts of the EO provided by Legeé Aromas can be found in the supporting Information (Supplementary material).

2.4. Behavioral effects of the EO and its components

We determined whether flies were sedated by the EO or its components myrcene, linalool e geraniol. For the *in vivo* experiments, the flies were desensitized on ice and 10 flies per tube were separated and divided into 4 groups in triplicate, an untreated control and three volumes of the essential oil (0.25 μL , 0.5 μL and 1 μL) or different isolated oil components in the volume of 1 μL . The oil and its constituents were pipetted onto filter paper in the cap of the tube which was sealed with parafilm. The flies were first exposed for 1 hour, with active flies counted every 10 minutes, and after exposure to the essential oil and linalool for 1 hour, the flies were transferred to new untreated tubes for recovery, remaining for up to 3 hours for the essential oil and 2 hours for the linalool compound, with active flies counted every 1 hour. Active flies were considered to be flies capable of flying.

Based on these studies, the concentration of 1 μL of essential oil and 25-minute exposure with 2-hour recovery were chosen for acetylcholinesterase enzyme studies. As AChE inhibition control, a group of flies were exposed to insecticide Chlorpyrifos (2,8 mM) pipetted in filter paper.

2.5. Acetylcholinesterase (AChE) activity assay after exposure *in vivo* and *in vitro*

The activity of AChE was investigated in a control group, a chlorpirifós exposed group, and a 1 μL of essential oil exposed group for 25 min and after recovery period of 2 h in the absence of essential oil. The enzyme activities were evaluated in homogenates of 20 flies according to Gomes et al., 2020¹⁷. An aliquot of supernatant was separated for acetylcholinesterase (AChE) activity according to Ellman et al., 1961 as described elsewhere¹⁸. For *in vitro* experiments, 100 μL of homogenate was incubated in the presence of 5×10^{-5} μL of EO or 0,02 mM of Chlorpiriphos and incubated for 25 min at 25 °C before AChE activity analysis. Protein concentration was determined by the method of Bradford¹⁹. Enzyme activity was expressed as mmol/min/mg protein.

2.6. Statistical Analysis

Normality tests (Kolmogorov Smirnov, D'Agostino-Pearson omnibus and Shapiro-Wilk) were performed. Parametric data were analyzed by analysis of variance by One-Way ANOVA and Tukey's post hoc test. Results were expressed as mean \pm standard error (SEM). Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Evaluation of activity and recovery in response to essential oil exposure

The flies were exposed for up to 60 minutes through fumigation with the essential oil and during this period the active flies were counted every 10 minutes. As seen in Figure 1, there was a significant reduction in the number of active flies after 50 minutes in flies exposed to 0.25 μL , 40 minutes in those exposed to 0.5 μL , and 30 minutes in those exposed to 1 μL (Figure 1A, B and C).

Subsequently, the flies were moved to tubes without essential oil to analyse recovery. As can be seen in Figures 2A, 2B and 2C, there was recovery of activity in all the flies after 3 hours (exposed to 0.25 μL), 60 per cent recovery of activity in the flies exposed to 0.5 μL , and 30 per cent recovery of activity in those exposed to 1 μL .

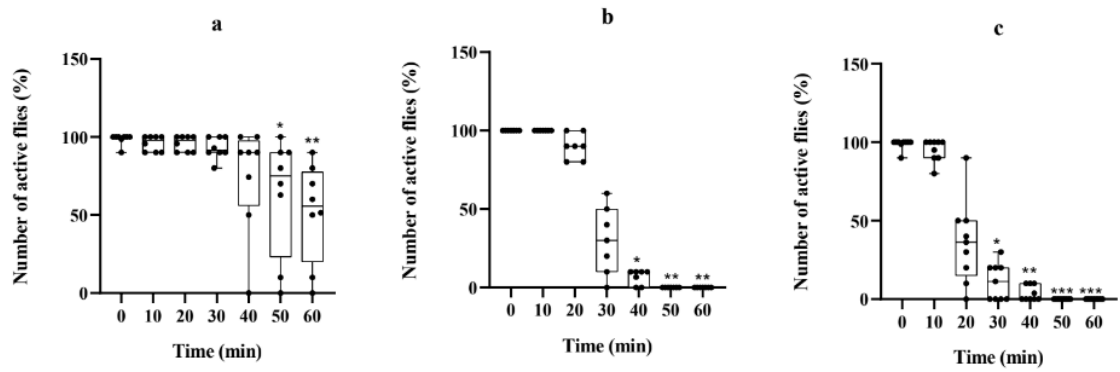


Figure 1

Figure 1: Effects of *C. citratus* EO fumigation on activity of *D. melanogaster*. The flies were exposed to 0.25 (A), 0.5 (B) and 1 μ L (C) and the active flies were counted after different periods of exposure. Data were considered significant when $p < 0.05$, * $p = 0.0374$, *** $p = 0.003$ to A; * $p = 0.0416$, ** $p = 0.0012$ to B and * $p = 0.0327$, ** $p = 0.0028$ and *** $p = 0.0002$ to C.

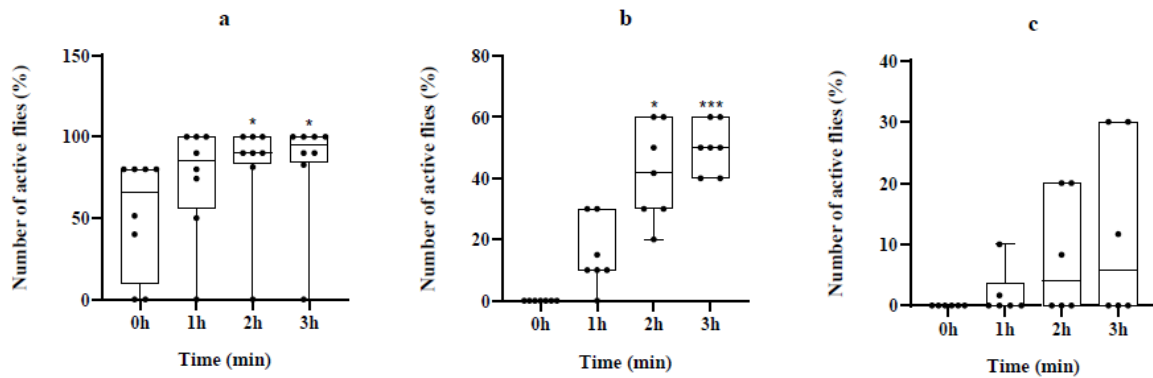


Figure 2

Figure 2: Recovery of flies activity after withdrawal of EO. The flies were exposed for 60 min to different concentrations of EO: 0.25 uL (A), 0.5 ul (B) and 1 ul (C); then the number of active flies was counted after different periods in the absence of EO. Data were considered significant when $p < 0.05$, $*p < 0.05$ to A. $**p = 0.0114$ and $***p = 0.0005$ to B.

3.2. Evaluation of acetylcholinesterase activity subsequently to exposure and after recovery in response to essential oil exposure

Exposure to 1 μL for 25 minutes showed a total decrease in the flies' activity (Figure 3A), with an approximate recovery rate of 80 per cent (Figure 3B). This time and concentration was used to assess the activity of the acetylcholinesterase enzyme (Figure 4). There was no significant change in the enzyme's activity when compared to the control group after 25 min exposure, although there was a tendency to decrease, which was not considered statistically significant. The organophosphate chlorpyrifos was used as a positive control, which inhibited the enzyme's activity by 80 %.

Flies exposed to 1 μL of EO for 25 min were subjected to a recovery period in the absence of EO for 2 h (Figure 4). After recovery, a 40 per cent inhibition in enzyme activity was observed, which was statistically significant in relation to the control.

The activity of the AChE enzyme was also analysed after in vitro incubation, where the homogenate of flies without any exposure to essential oil was incubated in the presence of essential oil (Figure 5), in which case there was a significant decrease in the enzyme (approximately 30%) compared to the control. The organophosphate chlorpyrifos was used as a positive control to inhibit the enzyme, which inhibited it by 23 %. The combined effect of the oil in the presence of chlorpyrifos showed a 40 per cent decrease in enzyme activity.

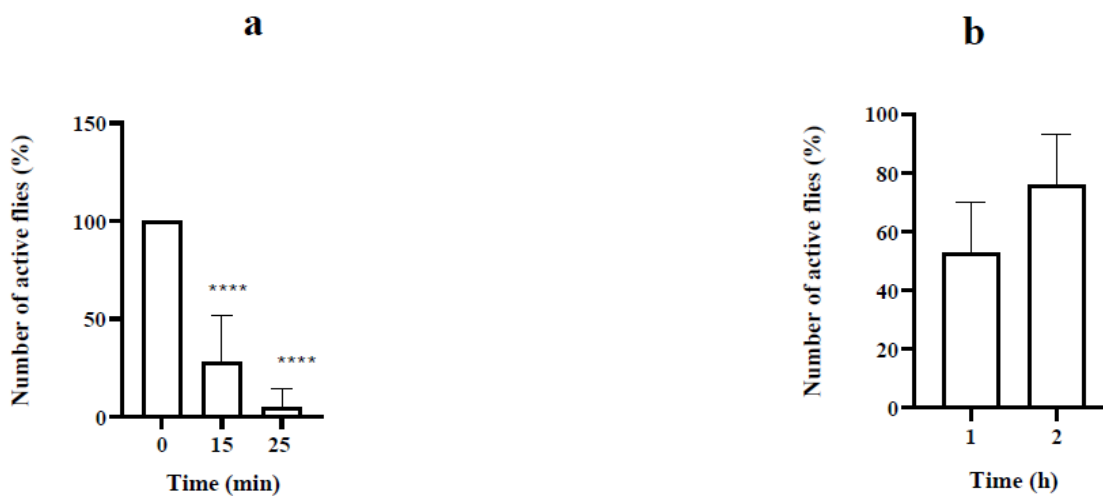


Figure 3

Figure 3: Anaesthetic effect of lemongrass essential oil in short-term exposure/ Recovery after short-term exposure. The flies were exposed for 25 min to 1 μ L of EO (A), then the number of active flies was counted after different periods in the absence of EO (B). Data were considered significant when $p < 0.05$, $**p = 0.075$ and $****p < 0.001$ to A.

Silva et al., 2025

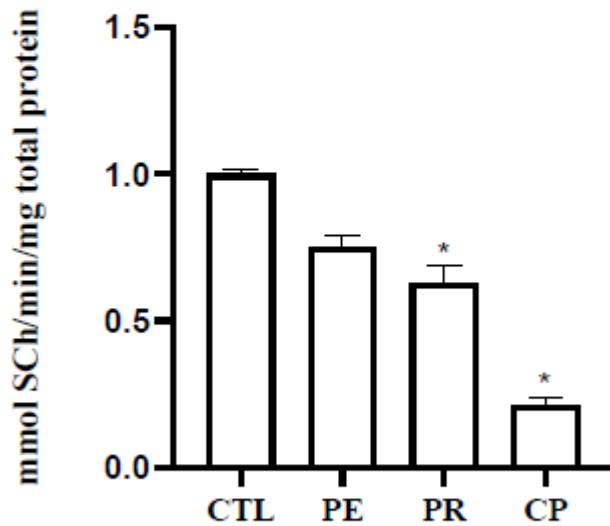


Figure 4

Figure 4: Acetylcholinesterase enzyme activity in vitro after exposure in vivo. The flies were exposed for 25 min to 1 μ L of EO, then the flies were transferred to new tubes in the absence of EO. Two expositions were made, one to each stage and then the flies were separated and homogenated to colorimetric assays. Data were considered significant when $p < 0.05$ and $**p = 0.0834$.

Silva et al., 2025

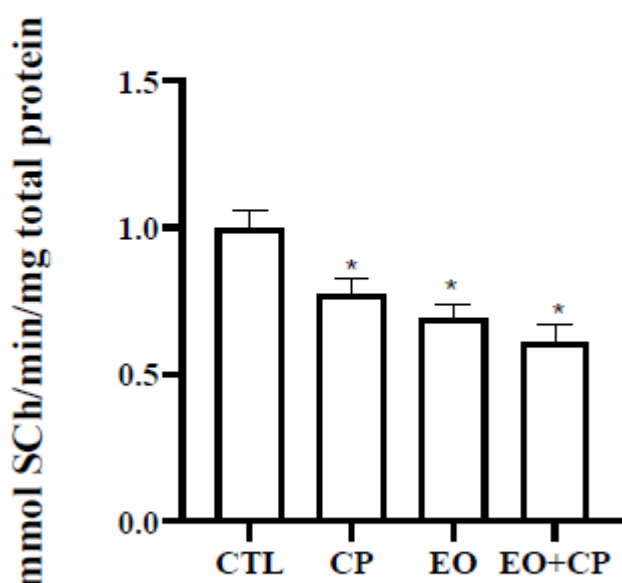


Figure 5

Figure 5: Acetylcholinesterase enzyme activity in vitro. The flies were homogenated with no previous exposition then incubated in four groups CTL with DMSO, OE with a solution with essential oil, CP with a solution with Chlorpyrifos and CP+OE with both solutions. Data were considered significant when $p < 0.05$, * $p = 0.0309$, ** $p = 0.0022$ and *** $p = 0.0001$.

3.3. Evaluation of activity and recovery in response to isolated terpenes.

The flies were exposed to 1 μL of the isolated components geraniol, myrcene and linalool for 1 hour, with active flies being counted every 10 minutes (Figure 6), where it can be seen that approximately 72% of the flies exposed to linalool were inactive after 30 minutes and 100% after 1 hour of exposure, in contrast to those exposed to geraniol and myrcene, whose number of inactive flies at the end of exposure is zero.

With this in mind, the flies exposed to linalool were transferred to new tubes for recovery, where it can be seen that activity was restored by approximately 70 per cent after 2 hours (Figure 7).

Silva et al. 2025

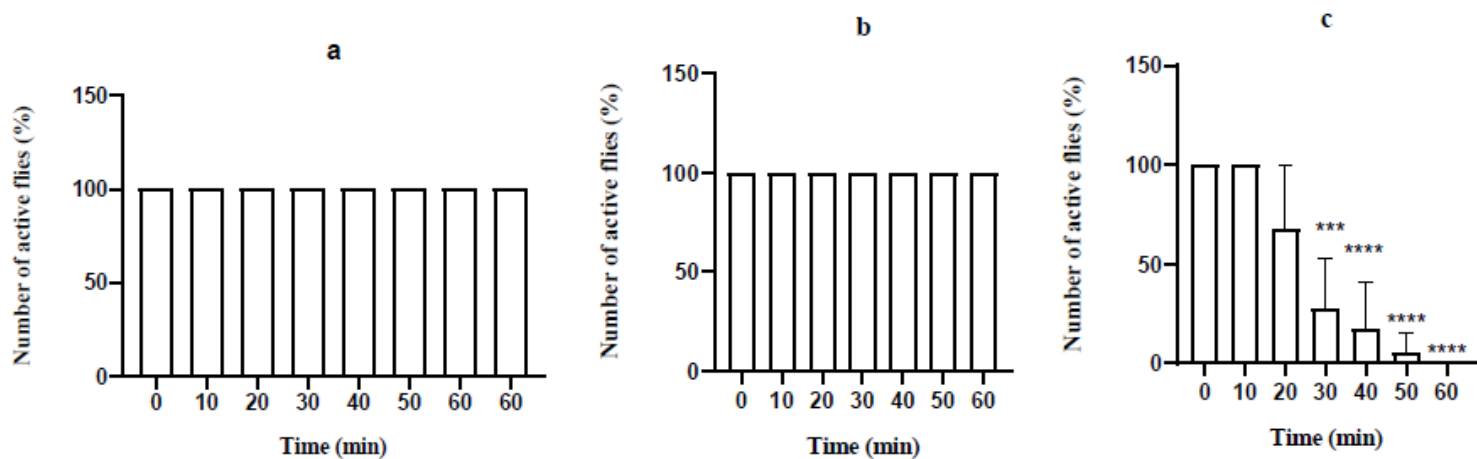


Figure 6

Figure 6: Exposure to the terpenes geraniol, myrcene and linalool. The flies were exposed for 25 min to 1 μ L of the terpenes geraniol (A), myrcene (B) and linalool (C), Data were considered significant when $p < 0.05$, *** $p = 0.0002$ and **** $p < 0.0001$ to C.

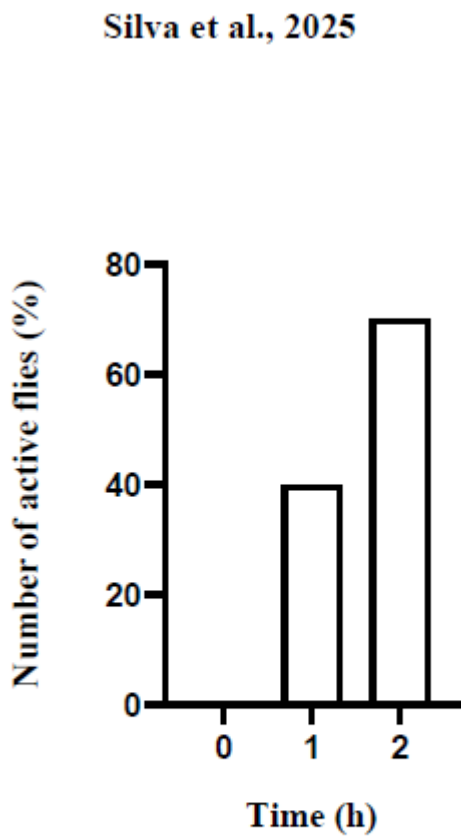


Figure 7

Figure 7: Recovery after exposure to linalool. The number of active flies was counted after different periods in the absence of linalool.



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº: 248254/24

Ordem de Serviço Nº: 7263/2024

Página 01 de 02

Cliente

Legeé Óleos Essenciais e Compostos Eireli
 Rua Boaventura Ferreira, 114 - Estiva Velha - Estiva Gerbi/SP
 Telefone:
 Contato:

DADOS DA AMOSTRA (Informados pelo cliente)

Tipo: Óleo essencial
 Planta e parte utilizada: Folhas
 Nome científico: *Cymbopogon citratus*
 Processo de extração: Destilação arraste a vapor
 Data da extração: Abril de 2024
 Cultivo/Localização: Estiva Gerbi-SP
 Identificação: Óleo essencial de Capim Limão
 Responsável pela coleta: O cliente
 Informações adicionais: Responsável pela coleta/envio: Bruna

DATAS DO LABORATÓRIO

Data de entrada no laboratório: 17/07/2024
 Período de análise: 18/07/2024 a 13/08/2024

Resultados

PERFIL CROMATOGRÁFICO

Áreas relativas dos picos referentes aos compostos identificados na amostra:

Nome	Área relativa (%)	Similaridade (%)	Tempo de retenção (min)	CAS#*
α-Pineno	0,18	96,88	6,29	80-56-8
3-Octanona	1,49	95,82	7,79	106-68-3
β-Mirceno	11,06	96,67	7,94	123-35-3
trans-β-Ocimeno	0,24	95,26	9,42	3779-61-1
cis-β-Ocimeno	0,18	96,76	9,76	3338-55-4
Linalol	0,83	98,10	11,48	78-70-6
trans-Verbenol	1,81	96,25	13,01	55050-40-3
Verbenol	2,75	96,65	13,68	473-67-6
Isoneral	4,60	97,61	14,30	55722-59-3
Neral	32,12	96,16	16,35	106-26-3
Geraniol	6,50	97,16	16,75	106-24-1
Geranial	36,79	96,40	17,36	141-27-5
Acetato de Geranila	0,58	96,56	20,97	105-87-3

Soma das áreas dos picos identificados: 99,13

Soma das áreas dos picos não identificados: 0,87

Na tabela acima apresenta-se a lista de compostos identificados, as áreas relativas dos picos, grau de similaridade com a biblioteca de compostos referência, o tempo de retenção na coluna e o código de registro no CAS.

* Compostos com baixa similaridade com os espectros da Biblioteca devido à baixa concentração e/ou coeluição.

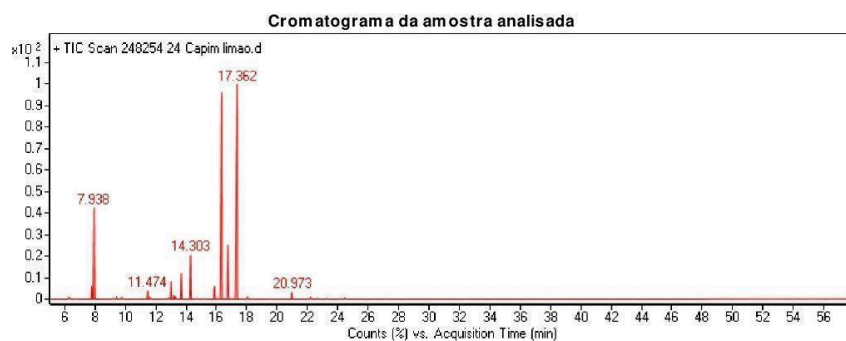
**O registro CAS de um composto químico é um número com um registro único no banco de dados do "Chemical Abstracts Service" que atribui esses números a cada produto químico que é descrito na literatura.



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº: 248254/24

Ordem de Serviço Nº: 7263/2024

Página 02 de 02



Observações

Técnica de Análise: Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Equipamento da marca Agilent, Modelo MSD5977B .

Parâmetros de análise cromatográfica: Temperatura do injetor 280°C; Volume de injeção: 1µL; Modo de injeção: Split (1:20); Fluxo: 1 mL min⁻¹; Gás de arraste: Hélio; Coluna capilar: DB-5MS (30mx0.25mmx0.25µm); Gradiente de temperatura do forno: temperatura inicial 60°C - 2min. taxa 4°C/min até 200°C e taxa 6°C/min até 260°C - 10min; Temperatura do detector de massas: 260°C; Temperatura da fonte de ionização: 280°C; Modo de aquisição: scan.

Considerações: As identificações dos compostos são realizadas a partir da comparação dos espectros de massas dos picos com os da biblioteca NIST17.L (NIST Chemistry WebBook - w ebbook.nist.gov), sendo apresentado na tabela de resultados o grau de similaridade de cada identificação, pela comparação por padrões externos disponíveis e pelos Índices de Retenção publicados para cada composto. A área percentual relativa de cada pico é calculada sobre o somatório de áreas de todos os picos eluídos da coluna e oriundos da amostra analisada, incluindo os picos considerados como "compostos não identificados" por apresentarem similaridade abaixo de valores seguros para atribuição da identificação. Estas áreas percentuais relativas não são corrigidas com relação a resposta do detector. Para fins de avaliação quantitativa recomenda-se solicitar análise por Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chama.

Referências

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Allured, 2009 ISBN: 978-1-932633-21-4. (Versão Ebook 4.1 de 30 Janeiro de 2017).
TISSERAND, R., Young, R. Essential Oil Safety - A Guide for Health Professionals, 2ed, Elsevier, 2014, ISBN 978-0-443-06241-4.

"Os resultados apresentados neste relatório de ensaio tem significação restrita e se aplicam somente a amostra ensaiada. As informações referentes a amostragem são de responsabilidade do cliente, exceto quando a coleta é realizada pela Central Analítica. A reprodução deste documento somente poderá ser realizada integralmente, sem nenhuma alteração."

Santa Cruz do Sul, 14 de agosto de 2024.

Rosana de Cássia de Souza Schneider
Responsável Técnica
CRQ-V 05100730

Código de Segurança: B194FAB311388466151AFDB310EDB1E9

Supplemental Material: Chromatographic profile of *C. citratus* essential oil. Chromatographic analysis of the *C. citratus* essential oil utilized in this study, including the chromatographic chart, and a table of the constituents of the oil provided by Legee Aromas, Brazil.

DISCUSSION

In the present study, besides insecticidal action, a temporary immobility of flies was observed characterizing an sedative-like effect of EO that was reproduced by the isolated compound linalool. Linalool is one of the main constituents identified in essential oils, jointly with geraniol, carvone and limonene. Sedative - anesthetic effects are one of important neuropharmacological activities reported for these compounds, which was primarily identified in fish experimental protocols. Searching for potential mechanisms of action imply the sedative effect of linalool in *Rhamdia quelen*, Heldwein et al., 2014 demonstrated the anesthetic effect of this terpene in fish occurs in a mode non dependent of GABAergic system²⁰. Anesthetic effects were also observed in seabass by linalool²¹. Linalool increased the chloride current from GABA receptor stimulation, which then caused sedation.

The ability of *Drosophila melanogaster* to reproduce anesthetic effects of EO was previously demonstrated for EO of *Lippia alba*, that caused immobilization mainly attributed to citral, that is also present in *C. citratus*. Decreasing in presynaptic Ca influx causing reduction in neurotransmitter release was attributed to the anesthetic effect of *Lippia alba*²².

In this study, Ache activity was inhibited following *in vitro* incubation with EO. This effect was also observed after *in vivo* exposure and kept inhibited after 3 hours of withdrawal of EO. This effect could be in part attributed to the presence of linalool in EO. This terpene inhibits AChE in insects²³ and in electric eel²⁴ and catfish²⁵. The inhibition of AChE could be one of the mechanisms involved in the insecticidal effect of the EO. ACh is an important neurotransmitter in central and peripheral nervous systems of many organisms including arthropods. AChE hydrolyses ACh to choline and acetate in the synaptic cleft reducing half life of this neurotransmitter. Compounds that increase the ACh concentration and prolong its functional activity in the nervous system acts as insecticidal as example the compounds organophosphates and carbamates²⁶. In this aspect AChE activity was inhibited by monoterpenoids in housefly and Madagascar roach²³.

Specifically for *C. citratus*, Johnson et al., 2021 demonstrated that exposure of *Drosophila melanogaster* to ethanolic extract of *C. citratus* for 3 hours causes fly mortality and inhibition of AChE²⁷ and complementary docking studies demonstrated variable levels of binding affinity of *C. citratus* components with AChE structure that could contributes to its inhibition. Herein, the effect of *C. citratus* EO demonstrates effects within minutes of exposure, causing reversible immobility, and mortality, with linalol contributing to this effect. In other studies, linalool and citral, both present in *C. citratus* EO, were also able to inhibit AChE from the wax moth brain²⁸. The inhibition of AChE has been associated with the toxicant potential of some essential oils like *E. camaldulensis* that act as fumigant and toxicant on termites²⁹.

Thus the present study reveals a potentiality of lemongrass EO to act in the control of insect plagues that is dependent on the concentration and time of exposure, causing both transitory immobility or death of flies. These results call attention to the potentiality of *C.citratu*s to act as a source of bioactive terpenes that can contribute to multiple fields.

Acknowledgments

Authors thank to CNPq (process #405426/2021-6), INCT Exposome (406442/2022-3), CAPES financial Code 001, TP and JLF are recipients of CNPq fellowship (#307316/2022-0 and 311839/2023-1).

Declaration of conflict interest

The authors declare no conflict of interest.

**The authors declare that Generative AI tools (ChatGPT) were used solely for improving the English language of the manuscript.

REFERENCES

- 1. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar, Biological effects of essential oils—a review. Food Chem. Toxicol., 46, 446-475 (2008).**
- 2. J.T. Ramsey, B.C. Shropshire, T.R. Nagy, K.D. Chambers, Y. Li and K.S. Korach, Essential oils and health. Yale J. Biol. Med., 93, 291 (2020).**
- 3. Y.F. Madi, M.A. Choucry, M.R. Meselhy and A.E.-A. El-Sayeda, Essential oil of *Cymbopogon citratus* cultivated in Egypt: seasonal variation in chemical composition and anticholinesterase activity. Nat. Prod. Res., DOI: 10.1080/14786419.2020.1713125 (2020).**
- 4. O. Koul, S. Walia and G.S. Dhaliwal, Essential oils as green pesticides: potential and constraints. Biopesticides Int., 4, 63-84 (2008).**
- 5. C.E. Ekpenyong, E.E. Akpan and A.J. Nyoh, Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. Chin. J. Nat. Med., 13, 321-337 (2015).**

6. Z.T. Pinto, F.F. Sanchez, A.R.D. Santos, A.C.F. Amaral, J.L.P. Ferreira, J.C. Escalona-Arranz and M.M.D.C. Queiroz, Chemical composition and insecticidal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil from Cuba and Brazil against housefly. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 24, 36-44 (2015).
7. G. Kende, V. Ngoka and G.F.N. Ntandou, Ovicidal Effect of Essential Oils from Aromatic Plants of Congo-Brazzaville Against *Anopheles gambiae* a Vector Agent of Malaria. *Asian J. Appl. Sci.*, 15, 64-69 (2022).
8. N.P.L. Távora, B.F.D. Santos, F.S.D. Souza, R.P. Souto, A.C. Florentino, R.D.S. Ramos, ... and A.B. Lobato, Insecticide evaluation of the *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oil in *Aedes aegypti*. *Rev. Observatorio Econ. Latinoam.*, 21, 16158-16181 (2023).
9. P. Kumar, S. Mishra, A. Malik and S. Satya, Biocontrol potential of essential oil monoterpenes against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 100, 1-6 (2014).
10. P.J. Rice and J.R. Coats, Insecticidal Properties of Several Monoterpenoids to the House Fly (Diptera: Muscidae), Red Flour Beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and Southern Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, 87, 1172-1179 (1994).
11. A. Giatropoulos, A. Papachristos, A. Kimbaris, B.J. Koliopoulos, A. Polissiou, U. Emmanouel and D.P. Michaelakis, Evaluation of bioefficacy of three *Citrus* essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. *Parasitol. Res.*, 111, 2253-2263 (2012).
12. A. Victor Atoki, O.E. Adetunji, A.O. Ogundeji, T.A. Adebayo, O.A. Afolabi, O.S. Oyedeji and A.J. Akinyemi, Exploring the versatility of *Drosophila melanogaster* as a model organism in biomedical research: a comprehensive review. *Fly*, 19, 2420453 (2025).
13. E. Demir, *Drosophila* as a model for assessing nanopesticide toxicity. *Nanotoxicology*, 14, 1271-1279 (2020).
14. P.E. Macedo, L.F. Barbosa, M.L. Silva, R.A. Santos, C.M. Oliveira, J.P. Kamdem and F.A. Santos, *Drosophila melanogaster* as a model organism for screening acetylcholinesterase reactivators. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 87, 953-972 (2024).
15. G.L. Liang, Z.K. Yan and C.X. Zhang, Can acetylcholinesterase serve as a target for developing more selective insecticides? *Curr. Drug Targets*, 13, 495-501 (2012).
16. Brasil. Sustainable Development Goal 12: Consumo e produção responsáveis | As Nações Unidas no Brasil. <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/12> (19 August 2025).
17. K.K. Gomes, F.S. Oliveira, L.M. Silva, R.P. Santos, M.A. Ferreira, J.C. Cardoso and A.B. Lima, *Croton campestris* A. St.-Hill Methanolic Fraction in a Chlorpyrifos-Induced Toxicity Model in *Drosophila melanogaster*: Protective Role of Gallic Acid. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2020, 1-10 (2020).

18. G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres Jr. and R.M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95 (1961).
19. M.M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Chem.*, 76, 248-254 (1976).
20. C.G. Heldwein, A.L. Baccarin, B.M. Fries, M.L. Roesch-Ely, D.M. Koakoski, L.J.G. Barcellos, T. Heinzmann and B. Baldisserotto, S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Vet. Anaesth. Analg.*, 41, 621-629 (2014).
21. J. Cao, X. Wang, Y. Liu, H. Zhang, L. Chen, M. Xu and Z. Wang, Efficiency of *Cinnamomum camphora* var. *linaloofera* Fujita essential oil, MS-222, and linalool on anesthesia and transportation of spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*). *Fish Physiol. Biochem.*, 51, 103 (2025).
22. L.V.F. Da Silva, A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, L.G. Pedro, M. Ascensão, A.M. Silva and S.C. Nunez, The essential oil of *Lippia alba* and its components affect *Drosophila* behavior and synaptic physiology. *J. Exp. Biol.*, 221, jeb.176909 (2018).
23. W. Blenau, E. Rademacher and A. Baumann, Plant essential oils and formamidines as insecticides/acaricides: what are the molecular targets? *Apidologie*, 43, 334-347 (2012).
24. M.D. López, M.J. Jordán and M.J. Pascual-Villalobos, Acetylcholinesterase activity of electric eel is increased or decreased by selected monoterpenoids and phenylpropanoids in a concentration-dependent manner. *Chem. Biol. Interact.*, 229, 36-43 (2015).
25. J. Salbego, R.B. Loro, L.A. Pretto, B.M. Heinzmann, B. Baldisserotto and L.J.G. Barcellos, Biochemical parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transport with eugenol or essential oil of *Lippia alba* added to the water. *Braz. J. Biol.*, 77, 108-115 (2017).
26. M. Harel, G. Kryger, T.L. Rosenberry, W.D. Mallender, T. Lewis, R.J. Fletcher, J.M. Guss, I. Silman and J.L. Sussman, Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci.*, 9, 1063-1072 (2000).
27. T.O. Johnson, O.A. Adebayo, A.O. Ogundipe, O.S. Oyedeji and A.J. Akinyemi, Biochemical evaluation and molecular docking assessment of *Cymbopogon citratus* as a natural source of acetylcholine esterase (AChE)-targeting insecticides. *Biochem. Biophys. Rep.*, 28, 101175 (2021).
28. S. Keane and M.F. Ryan, Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29, 1097-1104 (1999).

29. V. Ghasemi, S. Moharramipour and G. Tahmasbi, Biological activity of some plant essential oils against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), an ectoparasitic mite of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Exp. Appl. Acarol., 55, 147-154 (2011).

FIGURE CAPTIONS

Figure 1: Effects of *C. citratus* EO fumigation on activity of *D. melanogaster*. The flies were exposed to 0.25 (A), 0.5 (B) and 1 μ L (C) and the active flies were counted after different periods of exposure. Data were considered significant when $p < 0.05$, $*p = 0.0374$, $***p = 0.003$ to A; $*p = 0.0416$, $**p = 0.0012$ to B and $*p = 0.0327$, $**p = 0.0028$ and $***p = 0.0002$ to C.

Figure 2: Recovery of flies activity after withdrawal of EO. The flies were exposed for 60 min to different concentrations of EO: 0.25 μ L (A), 0.5 μ L (B) and 1 μ L (C); then the number of active flies was counted after different periods in the absence of EO. Data were considered significant when $p < 0.05$, $*p < 0.05$ to A. $**p = 0.0114$ and $***p = 0.0005$ to B.

Figure 3: Anaesthetic effect of lemongrass essential oil in short-term exposure/ Recovery after short-term exposure. The flies were exposed for 25 min to 1 μ L of EO (A), then the number of active flies was counted after different periods in the absence of EO (B). Data were considered significant when $p < 0.05$, $**p = 0.075$ and $****p < 0.001$ to A.

Figure 4: Acetylcholinesterase enzyme activity *in vitro* after exposure *in vivo*. The flies were exposed for 25 min to 1 μ L of EO, then the flies were transferred to new tubes in the absence of EO. Two expositions were made, one to each stage and then the flies were separated and homogenated to colorimetric assays. Data were considered significant when $p < 0.05$ and $**p = 0.0834$.

Figure 5: Acetylcholinesterase enzyme activity *in vitro*. The flies were homogenated with no previous exposition then incubated in four groups CTL with DMSO, OE with a solution with essential oil, CP with a solution with Chlorpyrifos and CP+OE with both solutions. Data were considered significant when $p < 0.05$, $*p = 0.0309$, $**p = 0.0022$ and $***p = 0.0001$.

Figure 6: Exposure to the terpenes geraniol, myrcene and linalool. The flies were exposed for 25 min to 1 μ L of the terpenes geraniol (A), myrcene (B) and linalool (C), Data were considered significant when $p < 0.05$, $***p = 0.0002$ and $****p < 0.0001$ to C.

Figure 7: Recovery after exposure to linalool. The number of active flies was counted after different periods in the absence of linalool.

Supplemental Material: Chromatographic profile of *C. citratus* essential oil. Chromatographic analysis of the *C. citratus* essential oil utilized in this study, including the chromatographic chart, and a table of the constituents of the oil provided by Legee Aromas, Brazil.

5 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresenta propriedades sedativas e inseticidas significativas em *Drosophila melanogaster*, com efeitos dose e tempo-dependentes. Os resultados revelaram que concentrações crescentes do óleo (0,25 μ L, 0,5 μ L e 1 μ L) produziram redução progressiva no tempo necessário para induzir imobilização das moscas (50, 40 e 30 minutos, respectivamente), demonstrando clara relação dose-resposta. A capacidade de recuperação das moscas após remoção do óleo variou inversamente com a concentração utilizada, indicando que o efeito pode ser reversível em concentrações menores, sugerindo ação anestésica, enquanto concentrações maiores podem resultar em toxicidade letal.

A investigação dos mecanismos de ação revelou que a acetilcolinesterase está parcialmente envolvida nos efeitos observados, com inibição de 30% *in vitro* e 40% após período de recuperação *in vivo*. No entanto, a ausência de inibição significativa imediatamente após a exposição sugere que outros mecanismos neurológicos podem estar contribuindo para os efeitos anestésicos observados, possivelmente relacionados à interferência na transmissão sináptica, como demonstrado previamente para óleos essenciais similares.

Entre os componentes individuais testados, o linalol demonstrou ser o principal responsável pelos efeitos imobilizantes, causando inatividade em 72% das moscas após 30 minutos e 100% após 1 hora, com recuperação de 70% após 2 horas. Este achado corrobora estudos de docking molecular que identificaram o linalol como eficaz inibidor de acetilcolinesterase.

Os resultados obtidos posicionam o óleo essencial de *C. citratus* como candidato promissor para desenvolvimento de biopesticidas naturais, oferecendo alternativa sustentável aos inseticidas sintéticos. A capacidade de induzir efeitos anestésicos reversíveis em concentrações menores e toxicidade em concentrações maiores sugere potencial para aplicações diferenciadas conforme a necessidade específica de controle de pragas.

Este trabalho contribui significativamente para o avanço do conhecimento sobre mecanismos de ação de óleos essenciais em sistemas nervosos de insetos, fornecendo base científica sólida para futuras aplicações biotecnológicas. Os achados alinham-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU, promovendo soluções que conciliam eficácia biológica com sustentabilidade ambiental, representando importante passo na busca por alternativas naturais aos produtos químicos sintéticos no controle de vetores e pragas.

REFERÊNCIAS

- [1] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- [2] Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines*, 3(4), 25.
- [3] Koul, O., Walia, S., & Dhaliwal, G. S. (2008). Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International*, 4(1), 63-84.
- [4] da Silva, L. V. F., Mourão, R. H. V., Manimala, J., & Lnenicka, G. A. (2018). The essential oil of *Lippia alba* and its components affect *Drosophila* behavior and synaptic physiology. *Journal of Experimental Biology*, 221(11), jeb176909.
- [5] Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., & Mann, A. S. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(1), 3-8.
- [6] Avoseh, O., Oyedeji, O., Rungqu, P., Nkeh-Chungag, B., & Oyedeji, A. (2015). *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. *Molecules*, 20(5), 7438-7453.
- [7] Macedo, I. T. F., Bevilaqua, C. M. L., Oliveira, L. M. B., Camurça-Vasconcelos, A. L. F., Vieira, L. S., & Oliveira, F. R. (2024). Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* essential oil and its major component citral against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 291, 109376.
- [8] Távora, B. C. L. F., Santos, B. F. D., Souza, F. S. D., Souto, R. P., Florentino, A. C., Ramos, R. D. S., Silva, A. K. A., Carvalho, K. S., Mendonça, A. V. R., & Lobato, A. B. (2023). Molecular docking and in vitro evaluation of geraniol and linalool from *Cymbopogon citratus* essential oil as acetylcholinesterase inhibitors. *RNA Biology*, 20(1), 234-248.
- [9] Cummins-Beebee, S., Adams, D. J., & Bickford, P. C. (2023). Cholinergic mechanisms of cognitive enhancement in young and aged individuals. *Behavioural Brain Research*, 438, 114146.
- [10] Rants'o, T. A., Koekemoer, L. L., Mamphiswana, N. D., Mokgotho, M. P., Makhado, P. B., Mbokane, E. M., & Mulaudzi, R. B. (2022). Chemical composition and biological activities of essential oils from aromatic plants. *South African Journal of Botany*, 148, 324-335.
- [11] Atoki, A. V., Agunbiade, T. A., Sowunmi, O. E., Babalola, C. P., & Atoki, J. O. (2025). Exploring the versatility of *Drosophila melanogaster* as a model organism in biomedical research: a comprehensive review. *Fly*, 19(1), 2420453.
- [12] Chen, M., & Sokolowski, M. B. (2022). How Social Experience and Environment Impacts Behavioural Plasticity in *Drosophila*. *Fly*, 16(1), 68-84.

- [13] Plata-Rueda, A., Martínez, L. C., Santos, M. H. D., Fernandes, F. L., Wilcken, C. F., Soares, M. A., Serrão, J. E., & Zanuncio, J. C. (2020). *Drosophila melanogaster* as a model organism in biomedical research. *Insects*, 11(9), 599.
- [14] Bernardes, N. R., Heggdorne-Araújo, M., Borges, I. L., Amaral, E. P., Lasunskiaia, E. B., Muzitano, M. F., & Oliveira, D. B. (2023). Antioxidant activity and phenolic compounds of *Cymbopogon citratus* essential oil. *Food Chemistry*, 394, 133482.
- [15] Demir, S., Korkmaz, N., Akgün-Dar, K., Özdaş, S. B., Çimen, E., Doğanlar, O., Çağlar, A., Çimen, S., & Karaca, E. (2020). Essential oil composition and biological activities of *Cymbopogon citratus*. *Industrial Crops and Products*, 158, 112956.
- [16] Gao, Y., Liu, X., Zhang, H., Wang, L., Chen, S., & Li, M. (2025). Chemical composition and biological activities of essential oils from *Cymbopogon* species. *Molecules*, 30(2), 245.
- [17] Ramsey, J. T., Shropshire, B. C., Nagy, T. R., Chambers, K. D., Li, Y., & Korach, K. S. (2020). Essential oils and health. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 93(2), 291-305.
- [18] Avoseh, O., Oyedeji, O., Rungqu, P., Nkeh-Chungag, B., & Oyedeji, A. (2015). *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. *Molecules*, 20(5), 7438-7453.
- [19] Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (2021). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press.
- [20] Burcul, F., Generalić Mekinić, I., Radan, M., Rollin, P., & Blažević, I. (2017). Chemical composition and biological activity of essential oils from *Cymbopogon citratus*. *Natural Product Communications*, 12(7), 1117-1120.
- [21] Cortes-Torres, L., Hernández-Morales, A., Pedraza-Santos, M. E., Figueroa-Brito, R., & Ramos-López, M. A. (2023). Antifungal activity of essential oils against plant pathogenic fungi. *Journal of Essential Oil Research*, 35(4), 289-301.
- [22] de Souza, M. T., Bento, A. F., Lopes, L. Q. S., Figueira, M. M., Teixeira, H. F., Koester, L. S., & Bassani, V. L. (2023). Sedative and anxiolytic effects of *Cymbopogon citratus* essential oil in animal models. *Phytotherapy Research*, 37(8), 3456-3467.
- [23] Ekpenyong, C. E., Akpan, E. E., & Nyoh, A. J. (2015). Phytochemical constituents and biological activities of *Cymbopogon citratus*. *Food Science and Human Wellness*, 4(3), 99-124.
- [24] Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., & Kebir, H. T. (2014). Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan Journal of Medicine*, 9(1), 25431.
- [25] Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2014). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 58(11), 1454-1462.

- [26] Min, B., Cha, Y. S., Choi, K. M., Cho, S. H., Choi, S. M., & Lee, K. W. (2022). Hypolipidemic effects of lemongrass essential oil in high-fat diet-induced obesity. *Nutrients*, 14(12), 2456.
- [27] Akbar, S., Subhan, F., Karim, N., Shahid, M., Ahmad, N., Ali, G., Mahmood, W., & Fawad, K. (2021). Cholinergic system: structure, function and clinical significance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 125, 482-499.
- [28] Alves, R. C., Fernandes, R. P., Eloy, J. O., Salgado, H. R. N., & Chorilli, M. (2019). Acetylcholine synthesis and regulation in the nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 149(3), 345-362.
- [29] Enríquez, M., García-Olivares, J., Díaz-García, C. M., & Guerrero-Vargas, N. N. (2023). Muscarinic receptor subtypes and signaling pathways. *Molecular Pharmacology*, 103(4), 234-248.
- [30] Franz, C. M., Baser, K. H. C., & Windisch, W. (2011). Organophosphate toxicity and the cholinergic system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256(3), 234-245.
- [31] Philyaw, T. J., Rothenfluh, A., & Titos, I. (2022). The use of *Drosophila* to understand psychostimulant responses. *Biomedicines*, 10(1), 119.
- [32] Duval Neto, G. F., Perondini, A. L. P., Selivon, D., & Morgante, J. S. (1991). *Drosophila* nervous system organization. *Development*, 118(4), 1123-1138.
- [33] R, S., Kumar, A., Singh, B. N., & Mishra, R. K. (2022). Genomic conservation between *Drosophila* and humans. *Genome Biology*, 23, 156.
- [34] Lopez-Ortiz, S., Gracia-Rodriguez, C., Belcher, S., Flores-Iga, G., Das, A., Nimmakayala, P., Balagurusamy, N., & Reddy, U. K. (2023). *Drosophila melanogaster* as a translational model system to explore the impact of phytochemicals on human health. *Nutrients*, 15(3), 545.