

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

KEYLLA LAVÍNIA DA SILVA OLIVEIRA

**EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS LIMON* (L.) EM *DROSOPHILA
MELANOGASTER* EXPOSTA AO CRACK**

Maceió

2022

KEYLLA LAVÍNIA DA SILVA OLIVEIRA

EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS LIMON* (L.) EM *DROSOPHILA MELANOGASTER* EXPOSTA AO CRACK

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro

Maceió

2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

O48e Oliveira, Keylla Lavínia da Silva.
 Efeitos do óleo essencial de Citrus limon (L.) em Drosophilla melanogaster
 exposta ao crack / Keylla Lavínia da Silva Oliveira. – 2022.
 30 f. : il.

Orientador: Olagide Wagner de Castro.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 27-30.

1. Drogas ilícitas. 2. Óleos voláteis - Limão. 3. Drosophila. I. Título.

CDU: 615.32

“É justo que muito custe o que muito vale”

Santa Teresa d'Ávila

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, meu SENHOR e meu mestre, por me guiar nos momentos em que os receios me cercavam, por renovar minhas forças nos momentos em que a jornada tanto me parecia pesar e por tantas bênçãos visíveis e invisíveis no meu caminhar. Sem Ele nada teria valor, nada teria sentido.

Aos meus pais, Josivaldo e Lucinei, meu pai que me ensinou com ações o quanto é preciso dedicar-se em busca de seus objetivos, e minha mãe por ser meu tão bom espelho, minha melhor amiga e meu apoio em todos os momentos.

À minha amada família, por acreditar em mim de forma tão generosa, agradeço de forma mais especial aos meus avós, José Martins (*in memorian*), Luciete Oliveira e Anália Messias (*in memorian*) pelo carinho, amor e exemplo dado. Agradeço minha avó Maria José, por me cuidar, criar, amar incondicionalmente e interceder por mim a Deus.

A Andrêsa e Rayane, que me fizeram compreender desde muito cedo o que é dito em Provérbios 18:24 “Há amigos mais chegados que irmãos” e por acreditarem em mim nos momentos em que eu não acreditei. A minha prima-irmã e tão amiga, Jarbiane, e minha doce amiga Jéssica, por me fazerem lembrar que Deus está comigo durante toda jornada.

A minha comadre e amiga-irmã, Amanda Freitas (*in memorian*), por me presentear com as maiores e melhores provas de confiança que alguém poderia ter recebido, e por marcar a minha vida tão profundamente com o seu amor e bondade.

As minhas afilhadas, Alice e Aléxia, dádivas em minha vida, que me trazem alegria e de forma inconsciente me ensinam tanto sobre a vida. Nem todo o meu amor é capaz de demonstrar a gratidão que é tê-las.

Aos amigos feitos durante a graduação, Allysson, Cinthia, Crislainy, Gabriel, Nathan e Thiago, que tornaram a caminhada mais leve, por vezes divertida e serão sem dúvidas grandes profissionais. De maneira mais generosa agradeço ainda as minhas amigas Bianca, Francisca e Jeyseane, com quem cultivei uma amizade de grande valor, compartilhando amor, respeito e admiração. E ao meu amigo João Victor, que quis a vida permitir que novamente fossemos amigos em sala de aula para assim solidificar nossa amizade.

As minhas amigas Andresa, Francielly e Tereza, por muitas vezes compreenderem minhas ausências, vibrarem com minhas conquistas e pelo amor e carinho mútuo.

A todos que compõe o Laboratório de Neufarmacologia e Fisiologia Integrativa, por terem sido meus companheiros nos últimos 4 anos, por me acolherem tão bem e por compartilhar seus conhecimentos, agradeço a todos e sobretudo a Amanda, Bruno, Fernanda, Jucilene e Rayssa, pessoas com quem partilhei não só estudos e dados, mas sim conversas e sentimentos para além dos muros da universidade.

E ao meu orientador, Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro, por ter me aceito no LNFI, me permitir todas as experiências vividas no mundo da pesquisa, onde amadureci e aprendi tanto. E por sua compreensão e orientação em cada etapa que passei

RESUMO

O *crack*, cocaína em sua forma fumada, é um grave problema de saúde pública, uma vez que é uma droga de abuso que atua no Sistema Nervoso Central (SNC) promovendo alterações comportamentais, de cognição, movimento e reprodutivas, além de causar dependência. No Brasil o crescente uso de drogas psicoativas é um desafio, devido às dificuldades de controle, falta de investimento e políticas sociais direcionadas especialmente aos usuários de *crack*. Óleos essenciais vem sendo utilizados como terapia alternativa no tratamento de diversas doenças por apresentar benefícios multifatoriais, como ações anti-inflamatória, antioxidante, anticonvulsivante, ansiolítica, antidepressiva, antinociceptiva, antimicrobiana e neuroprotetora. Uma espécie de óleo que vem sendo muito estudada é o *Citrus limon* (OECL). O óleo de *Citrus limon* (L.) vêm sido amplamente estudada em diversas doenças, por apresentar efeitos multifatoriais. Apesar disso, estudos acerca do uso de OECL nos mecanismos moleculares e comportamentais promovidos pelo *crack* são escassos. *Drosophila melanogaster* está entre os organismos modelos para diversos estudos recentes na área de mutagênese e da toxicologia, sendo considerada como substituto promissor para animais mais complexos em testes laboratoriais devido às suas inúmeras vantagens de manipulação, baixo custo, capacidade de gerar grandes populações, ciclo de vida curto, estágios de desenvolvimento claramente distintos, sequência genômica conhecida e similaridade fisiológica com o ser humano. Nessa perspectiva, o objetivo do presente trabalho é investigar os possíveis efeitos da administração de OECL em *Drosophila melanogaster* em diferentes estágios de desenvolvimento. Para essa finalidade, larvas de *Drosophila* em estágio larval 1 foram expostas a meio padrão acrescido, ou não, de *crack* e/ou OECL, sendo avaliada toxicidade pelo desenvolvimento larval, capacidade motora e comportamento do tipo depressivo cognitiva pelos testes de rastejamento larval, arena de campo aberto e nado forçado, respectivamente. Nossos resultados demonstraram que os grupos expostos ao *crack* tiveram um menor número de pupas e eclosões quando comparado aos grupos que foram expostos ao *crack* e tratados com o óleo essencial de *limon*, também verificou-se um aumento na locomoção de ambos os grupos *crack* em relação ao controle, adicionalmente não foi observado comportamento do tipo depressivo no teste do nado forçado. Estes fatores corroboram para que *Drosophila* seja um modelo eficiente para testar toxicidade e elucidar mecanismos moleculares causados pela exposição ao *crack*. Neste estudo os resultados reforçam a hipótese de sensibilização independente de altas doses psicoestimulantes, bem como demonstra existir um limiar de concentração máxima tolerada para o uso de óleo essencial em torno de 0,2%. Os resultados apresentaram de forma inédita na literatura, que OECL reduziu a atividade locomotora, bem como realçaram a importância da descoberta de novos tratamentos alternativos para a dependência em *crack*. Além disso, evidenciaram os efeitos positivos do OECL como promissor recurso terapêutico na qualidade de vida de usuários de *crack*.

Palavras-chave: Drogas de abuso. Óleo essencial de limão. *Drosophila*.

ABSTRACT

Crack, cocaine in its smoked form, is a serious public health problem, since it is a drug of abuse that acts on the Central Nervous System (CNS) promoting behavioral, cognition, movement and reproductive changes, in addition to causing dependence. In Brazil, the growing use of psychoactive drugs is a public health problem, due to difficulties in control, lack of investment and social policies aimed especially at *crack* users. Thus, alternative therapies have been widely developed by several researches. Essential oils have been used as an alternative therapy in the treatment of various diseases due to their multifactorial benefits, such as anti-inflammatory, antioxidant, anticonvulsant, anxiolytic, antidepressant, antinociceptive, antimicrobial and neuroprotective actions. A species of oil that has been extensively studied is *Citrus limon* (OECL). Despite these data, studies on the use of OECL in the molecular and behavioral mechanisms promoted by *crack* are largely scarce. *Drosophila melanogaster* is among the model organisms for several recent studies in the field of mutagenesis and toxicology, being considered a promising substitute for more complex animals in laboratory tests due to its numerous advantages in handling, low cost, ability to generate large populations, cycle of short life span, clearly distinct developmental stages, known genomic sequence, and physiological similarity to humans. In this perspective, the objective of the present work is to investigate the possible effects of OECL administration on toxicity, motor and cognitive capacity in *Drosophila melanogaster* exposed to *crack* at different stages of development. In the results, it was verified that the groups exposed to *crack* had a decrease in the number of pupae and hatches when compared to the groups that were exposed to *crack* and treated with *Citrus limon* essential oil, there was also an increase in locomotion of both groups *crack* in relation to the control, additionally, no depressive-like behavior was observed through the adopted methodology. These factors confirm that *Drosophila* is an efficient model to test toxicity and elucidate molecular mechanisms caused by exposure to *crack*. In this study, the results reinforce the hypothesis of independent sensitization of high doses of psychostimulants, as well as demonstrating that there is a threshold of maximum tolerated concentration for the use of essential oil around 0.2%. The results showed, in an unprecedented way in the literature, that OECL reduced locomotor activity, as well as highlighted the importance of discovering new alternative treatments for *crack* addiction and highlighted the positive effects of OECL, which are promising therapeutic resources to increase the quality of life of *crack* users.

Keywords: Drug abuse, Essential oil of lemon, *Drosophila*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Material Biológico.	12
3.2 Substâncias testadas	12
3.3 Avaliação da dose-resposta do óleo essencial de limão (OECL).....	12
3.4.1 Grupos experimentais	12
3.4.2 Teste de rastejamento larval.....	13
3.4.3 Arena de campo aberto	13
3.4.4 Ensaio de nado forçado.....	13
3.5 Análise estatística.....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Desenvolvimento Larval	15
4.2 Exposição das <i>Drosophila</i> ao <i>crack</i> e óleo essencial de limão (OECL) e Ensaio de desenvolvimento	17
4.3 Rastejamento Larval	19
4.4 Arena de Campo Aberto	21
4.5 Nado forçado.....	23
5. CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

De acordo a Organização Mundial da Saúde (OMS,2006), drogas de abuso são substâncias que atuam no Sistema Nervoso Central (SNC) promovendo alterações de comportamento, humor, cognição, nos distúrbios de movimento e reprodutivas, além de causar dependência. O crescente uso de drogas psicoativas é problema de saúde pública, devido às dificuldades de controle, falta de investimento e políticas sociais direcionadas (PRATA, E.M.M., 2009).

No mundo, cerca de 35 milhões de indivíduos sofrem transtornos psicológicos, comportamentais e outros em decorrência do uso de drogas, apesar disso apenas uma a cada sete pessoas recebe tratamento (United Nations Office on Drugs and Crime;2019). Dentre as principais drogas de abuso, consideradas mais prejudiciais, com devastadores efeitos para o organismo, estão a cocaína e seu derivado, o *crack*. A cocaína é uma substância com alta capacidade de promoção da dependência química e psíquica, provocando alteração do humor, excitação, euforia e desinibição, além disso, em doses elevadas é pode provocar psicoses compulsivas (PHILIPSEN et al, 2020).

A cocaína, em geral,estar associada a um usorecreativo de classes sociais com alto poder aquisitivo, enquanto o uso do *crack* se estendeem várias classes sociais (KESSLER & PECHANSKY, 2008), porém tem seu maior nicho social de atuação nas classes marginalizadas e negligenciadas (PUCHERIO et al, 2010). O *crack* é obtido por meio do aquecimento da pasta base da cocaína, que após o cozimento precipita em forma de cristais, sendo administrada por meio da inalação de seus vapores produzidos após a queima (FISCHMAN, 1988). Devido a sua via de administração, o *crack* se torna uma droga tão viciante quanto a cocaína. Enquanto essa última é utilizada em forma de pó, o crack é utilizado fumado e com isso, apresenta liberação mais rápida na corrente sanguínea chegando com alta biodisponibilidade e rápido metabolismo. Com isso, esta substância apresenta um efeito curto e intenso o que acarreta ao usuário o desejo intenso de uso de mais droga, conhecido como “fissura”.

Em decorrência disso, o indivíduo passa a ter comportamentos violentos, além de comportamento sexual promíscuo, em troca de mais substância, o que possibilita aumento do risco de contaminação por infecções sexualmente transmissíveis (CASTRO-NETO et al, 2020). Adicionalmente, o *crack* provoca impactos negativos na vida dos usuários, os quais apresentam sintomas psiquiátricos, como ansiedade, depressão e nas relações

interpessoais (PAIVA et al., 2017). Além das consequências cognitivas e afetivas, também existem alterações pronunciadas no controle sensório-motor, as quais estão associadas a alterações funcionais nas redes neurais relacionadas ao movimento (HANLON et al., 2010).

Em contrapartida, apesar de todos os efeitos elencados, atualmente não existe tratamento efetivo para os sintomas relacionados aos efeitos do uso de *crack* e a dependência associada (BUCHHOLZ; SAXON, 2019). Nesta perspectiva, há urgente necessidade de estudos focados em alternativas terapêuticas que gerem resposta satisfatória no paciente. Neste contexto, produtos naturais têm despertado grande interesse no campo da terapia alternativa e da medicina complementar para tratamento de transtornos de comportamento e diversas outras doenças que acometem o sistema nervoso central (SNC) (CASTRO et al, 2018).

Entre os produtos naturais estudados na literatura, os óleos essenciais estão rapidamente ganhando popularidade, por meio da aromaterapia, pois podem ser usados para aliviar os sentimentos negativos de abstinência de drogas ou álcool (KEUNG; VALLEE, 1993; KULKARNI; NINAN, 1997; PENETAR et al., 2015). Há registros de efeitos multifatoriais e benéficos no uso de óleos essenciais como o óleo essencial de *Citrus limon* (L.) (OECL) em múltiplas doenças, tendo ações anti-inflamatória, antioxidante, anticonvulsivante, ansiolítica, antidepressiva, antinociceptiva, analgésica, antimicrobiana e neuroprotetora (JOHNSON, 2019; OBOH; OLASEHINDE; ADEMOSUN, 2014; YAZGAN; OZOGUL; KULEY, 2019; ZHANG et al., 2018).

Apesar desses achados, permanecem amplamente desconhecidos os efeitos do óleo essencial de *C. limon* (OECL) nos mecanismos moleculares e comportamentais promovidos pelo *crack*. Assim, a literatura atualmente é carente de estudos que possam relacionar os potenciais benefícios da substância para amenizar comportamentos ocasionados pelo uso de drogas como o *crack*. Além disso, embora apresente amplos benefícios, os óleos essenciais também podem desenvolver atividade inseticida o que faz necessário investigar os possíveis efeitos de sua administração.

A família Drosophilidae é composta por cerca de 4.200 espécies, distribuídas em diversos gêneros. A *Drosophila* é o gênero mais estudado, com 1.180 espécies já conhecidas, dentre as quais, a *Drosophila melanogaster* (conhecida popularmente como moscada fruta) é a mais estudada pela ciência (De Ré, 2014; Debat et al., 2011). *D.*

melanogaster está entre os organismos modelos para diversos estudos recentes relacionados a mutagênese e toxicologia.

Além disso, a espécie é considerada como substituto promissor para animais mais complexos em testes laboratoriais devido às suas inúmeras vantagens de manipulação, baixo custo, capacidade de gerar grandes populações e ciclo de vida curto (NOBREGA & LYONS, 2017). Atualmente, estudos que investigam os efeitos fisiológicos de drogas de abuso também vêm sendo realizados por meio deste modelo experimental, a exemplo de etanol (PETRUCCELI et al, 2020), nicotina (McDonald & HIGFILL, 2020), maconha (GÓMEZ et al, 2019) e cocaína (BAINTON, 2000).

Em estudos que avaliaram os efeitos da cocaína em *D. melanogaster* foi observado que é possível induzir respostas motoras (hiperlocomoção) resultantes da exposição à cocaína semelhantes àsquelas apresentadas em roedores. O que sugere que os mecanismos de resposta são conservados evolutivamente até animais vertebrados mais complexos, como os mamíferos, apesar da notória diferença entre suas anatomias (PUCHERIO et al,2010; De NOBREGA & LYONS, 2017).

Dessa forma, apesar dos avanços no conhecimento sobre os efeitos do uso cocaína no modelo de *D. melanogaster* pouco se sabe sobre esses efeitos após administração de *crack*. . Diante disso, acreditamos que a compreensão destas alterações possibilitará avanço científico significativo que permitirão desenvolvimento de novas estratégias para o monitoramento e tratamento os quais poderão aumentar a sobrevivência e a qualidade de vida de pacientes usuários de *crack*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar os possíveis efeitos toxicológicos causados pelo *crack* em *D. melanogaster* em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como o potencial do óleoessencial de *Citrus limon* (OECL) na redução da atividade toxicológica e psicoestimulante do *crack*.

2.2 Objetivos específicos

- i. Identificar as alterações causadas pela ingestão de *crack* na locomoção de *D. melanogaster* tratadas ou não com OECL;
- ii. Avaliar a toxicodependência causada pela ingestão de *crack* em *D. melanogaster* tratadas ou não com OECL;
- iii. Avaliar se a ingestão de *crack* causa comportamento do tipo depressivo em *D. melanogaster* tratadas ou não com OECL;
- iii. Identificar alterações causadas pela ingestão de *crack* no desenvolvimento normal de *D. melanogaster* quando na fase adulta tratadas ou não com OECL.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

Moscas adultas machos e fêmeas da espécie *D. melanogaster* (linhagem Canton S), foram mantidas em condições controladas de temperatura (~25°C), luz em ciclo claro-escuro 12/12h e umidade, no biotério setorial do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI) em parceria com o Laboratório de Toxicologia *in vivo*. Ambos laboratórios fazem parte do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas – UFAL.

3.2 Substâncias testadas

Foi utilizado o OECL da indústria FERQUIMICA na concentração de 0,2% por via oral. O *crack*, foi obtido por intermédio da delegacia de entorpecentes da cidade de Maceió - AL, precedida da devida autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e ordem judicial determinando a entrega e armazenamento da substância no LNFI – UFAL, foi utilizado na concentração de 0,75mg/ml e 1,5mg/ml por via oral.

3.3 Avaliação da dose-resposta do óleo essencial de limão (OECL)

As moscas foram expostas por via oral, por meio de mistura em meio padrão, composto de fubá, fermento, ágar e sacarose, contendo OECL na comida. A realização de estudo de dose foi necessária para avaliar o potencial de toxicidade do OECL nas moscas. Foram preparados *vials* contendo meio padrão e o óleo nas seguintes concentrações: (i) CTRL; (ii) TWEEN 80 0,2%; (iii) 0,06% OECL; (iv) 0,2% OECL; (v) 0,5% OECL; (vi) 1% OECL. Foi realizado em quadruplicata para cada concentração contendo 30 larvas (L1) em cada *vial* e em seguida observado o número de pupas e o tempo em dias necessário até a pupação, para assim escolher a melhor dose para os próximos passos do estudo.

3.4.1 Grupos experimentais

As moscas (fase larval e adulta) foram expostas por via oral, por meio de mistura em meio padrão de *crack* e/ou OECL na comida. As moscas foram divididas nos seguintes grupos experimentais: (i) CTRL; (ii) CTRL + TWEEN 80; (iii) CRACK 0,75 mg/ml (iv); CRACK 1,5mg/ml (v); CRACK 0,75mg/ml + OECL 0,2% (vi) e CRACK 1,5mg/ml + OECL (vii).

3.4.2 Teste de rastejamento larval

O teste de rastejamento, utilizado para identificar problemas na locomoção larval (NICHOLS., 2012), foi realizado a partir de larvas mantidas em meio padrão para *D. melanogaster* (CTRL) ou meio padrão acrescido de diferentes concentrações de *crack* (expostas), tratadas com OECL após 24 horas das larvas terem chegado ao estágio L3. Para a execução do teste de rastejamento larval foram utilizadas 15 larvas de cada grupo experimental, sendo colocadas em uma placa de 20 cm de diâmetro coberta por agarose simples corada com suco de uva integral sobreposta à uma folha de papel milimetrado. Cada larva foi colocada sobre o gel de agarose para ter o rastejamento filmado durante 1 minuto. Foi avaliado as distâncias percorridas pelas larvas expostas ao *crack* com aquelas percorridas pelo grupo de larvas mantidas em meio padrão para *D. melanogaster* bem como com o grupo tratado com OECL.

3.4.3 Arena de campo aberto

O teste arena de campo aberto é um teste eficiente para verificar o comportamento motor e exploratório do animal (HIRTH., 2010). Foi utilizado o protocolo modificado de Necksmeyer e Matsuo (2008), que consistem em submeter o animal a caminhada por um período de 1 minuto onde, a distância percorrida pelo animal é contabilizada. Neste ensaio foram utilizadas 15 moscas adultas machos por grupo experimental, com média de 2 a 3 dias de vida. Cada animal foi separado e anestesiado com CO₂ e acondicionado individualmente em tubos do tipo *Eppendorf* com comida acrescida de *crack*, OECL ou *crack*+OECL e/ou não. Foi utilizado uma placa de Petri de 60 mm com gel de agarose, colocada sobre um papel milimetrado com uma grade de 1 cm quadrados, com tampa transparente sobre a placa; o que limitava o espaço de permanência do animal, ao impedir o seu voo. Foi avaliado pelo número de cruzamentos percorridos o comportamento exploratório através do espaço percorrido no período de 1 minuto.

3.4.4 Teste do nado forçado

O teste de nado forçado tem como finalidade avaliar o comportamento do tipo depressivo no animal (PETIT-DEMOULIERE, et al., 2005). No ensaio foram utilizadas um total de 10 moscas machos por grupo, cada animal foi anestesiado com CO₂ e acondicionado individualmente em tubos do tipo *Eppendorf* com comida acrescida de *crack*, OECL ou *crack*+OECL. Individualmente as moscas foram colocadas em poços de 4 ml contendo soro fisiológico. As moscas foram submetidas ao nado por um período de 3 minutos, em que foram contabilizados os episódios de duração do nado e o tempo de imobilidade durante todo o teste. Ao final de cada teste verificou-se o comprometimento motor de

cada animal ao retirar do poço e observar a sua capacidade de caminhar e posteriormente, voar (HIRTH, 2010).

3.5 Análise estatística

As análises estatísticas do teste de rastejamento larval e desenvolvimento normal foram realizadas usando o programa GraphPad Prism (version 6.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) analisados pelo (ANOVA) one-way, seguido pelo teste de comparação Tukey; considerando significativo $p < 0,001$ comparado ao controle. Os dados do ensaio de sobrevivência foram analisados utilizando o teste de log-rank, sendo considerado $p < 0,001$ para valores significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da dose-resposta do OECL em *Drosophila melanogaster*

Essa avaliação foi realizada por meio da análise do período de pupação e eclosão em *D. melanogaster* expostas a diferentes concentrações de OECL. O estudo de dose se fez necessário, pois óleos essenciais podem apresentar toxicidade em insetos e moscas, o que compromete o desenvolvimento larval, atraso na fase de pupa e assim todo o ciclo da espécie (MIHAJLOV-KRSTEV, et al., 2014). Em contrapartida, apresenta diversas atividades biológicas importantes como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, anticonvulsivante, ansiolítico, antidepressivo, antinociceptivo e neuroprotetor o que reforça a escolha dessa substância como possível tratamento.

Devido à natureza de suas moléculas, óleos essenciais não são diluídos em água. Dessa forma, para permitir uma incorporação do óleo utilizado ao meio padrão de *D. melanogaster*, o mesmo foi emulsionado com TWEEN 80 a 0,2% como é descrito na literatura (SILVA, B., 2020). Na análise do período de pupação foi avaliada a porcentagem de larvas que atingiram a fase de pupa tendo recebido as seguintes doses de OEC: 0,06%; 0,2%; 0,5% e 1% (Figura 1). Assim como também foi analisado a quantidade de pupas que atingiram a fase adulta (Figura 2). Os grupos foram organizados em quadruplicatas contendo 30 larvas em cada vial. Durante o estágio de pupa ocorre a maior quantidade de mudanças na expressão gênica podendo desencadear alterações o que ratifica a necessidade de observar como o OECL pode interferir no ciclo de vida de *D. melanogaster* (FERNÁNDEZ-MORENO, 2007).

4.1.1 Desenvolvimento Larval

O estágio de pupa iniciou no 5º dia após a coleta larval. As pupas foram mantidas nos frascos a fim de avaliar a taxa de mortalidade nesse estágio de vida. Ao comparar as diferentes concentrações do OECL, observamos que os diferentes OECL a 0,5% apresentou uma significativa diminuição no número de larvas que atingiram o estágio de pupa, ao mesmo tempo em que o grupo exposto à concentração de 1% não conseguiu evoluir para fase de pupa. As demais concentrações não apresentaram alterações no desenvolvimento de larvas ou pupas.

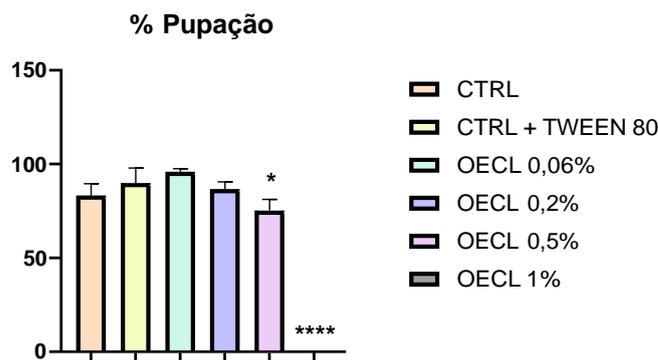


Figura 1. Porcentagem de pupação de *Drosophila melanogaster* exposta ao óleo essencial de *Citrus limon* (OECL) em diferentes concentrações. Resultados expressos em \pm Erro Padrão da Média (E.P.M). One-way ANOVA seguida do *post hoc* de Tukey. * $p < 0.01$ ou **** $p < 0.0001$ em relação ao grupo controle (CTRL), $n = 30$ larvas.

Para avaliar a sobrevivência de *D. melanogaster* foi contabilizado o número de pupas que eclodiram em moscas adultas com as eclosões iniciadas 3 dias após o início da fase pupal, e seguida por mais 7 dias. Conforme mencionado anteriormente, o grupo exposto a concentração de 0,1% não obteve pupas o que comprometeu o desenvolvimento para as seguintes formas de vida (Figura 2). Observa-se assim toxicidade induzida por altas doses de OECL (0,5% e 1%), já que essas provocaram uma menor sobrevivência na fase de pupa e a não evolução para as demais fases de vida das moscas.

Em concordância com outros estudos, doses de óleos essenciais superiores a 0,3% apresentaram maior toxicidade enquanto a concentração máxima tolerada foi em torno de 0,2% (IDAOMAR et. al., 2002). Dessa forma, a concentração de OECL 0,2% foi escolhida para ser utilizada nos testes posteriores.

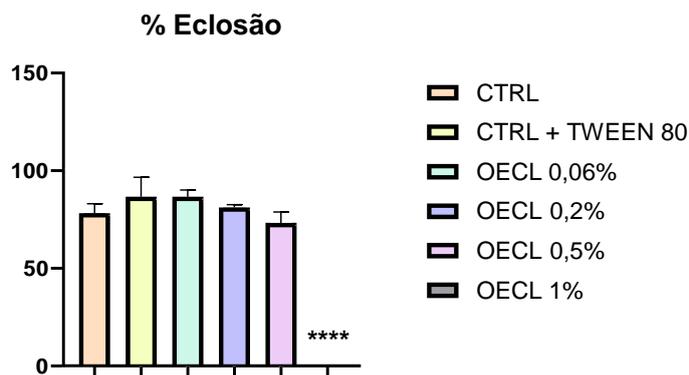


Figura 2. Porcentagem de eclosão de *Drosophila melanogaster* exposta ao óleo essencial de *Citrus limon* (OECL) em diferentes concentrações. Resultados expressos em \pm Erro Padrão da Média (E.P.M). One-way ANOVA seguida do *post hoc* de Tukey. **** $p < 0.0001$ em relação ao grupo controle (CTRL), n= 30 larvas.

4.2 Exposição de *Drosophila melanogaster* ao crack e óleo essencial de limão (OECL):Ensaio de desenvolvimento

O acompanhamento, observação e desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* foi observado por meio da contabilização do número de pupas e eclosões diárias. Os resultados obtidos apresentaram diferença significativa ($*p < 0,05$) entre os grupos OECL 0,2% e Crack 1,5 mg/ml, quanto ao número de pupas e o tempo necessário para que 50% das larvas pupassem (Figura 3).

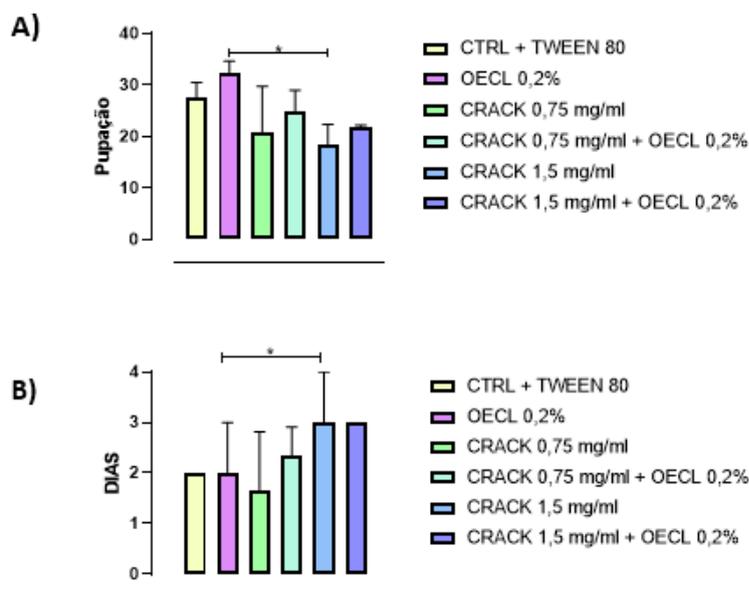


Figura 3. Pupação de *Drosophila melanogaster* após exposição ao crack e óleo essencial de Citrus limon. (A) Número de pupas e (B) tempo de pupação. Valores expressam a média +/- erro padrão da média das medidas obtidas nas triplicatas. ANOVA one-way, pós-teste Tukey. ** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ n=30 larvas. Fonte: Autor

Em **A** houve uma Diminuição no número de pupas nas concentrações de 0,75 mg/ml e 1,5 mg/ml de *crack* em relação as concentrações de 0,75mg/ml e 1,5 mg/ml de *crack* + OECL 0,2% respectivamente e uma diminuição significativa na contagem de pupas 1,5 mg/ml em relação ao grupo tratado, apenas, com OECL 0,2%. E em **B** foi observado um aumento significativo no tempo de pupação de 50% das larvas em relação aos grupos CTRL + TWEEN 80 e OECL 0,2%.

Apesar de não ser uma via comumente utilizada para exposição ao *crack*, na literatura há relatos da utilização da cocaína por via oral em *D. melanogaster*. Esta exposição tem sido descrita como capaz de produzir efeitos deletérios da exposição de cocaína neste modelo animal (WILLARD, 2006). Uma das consequências da ingestão de cocaína por *D. melanogaster* é a alteração em neurotransmissores como a dopamina e serotonina, essas interferências a níveis moleculares podem desenvolver degeneração tecidual, modificações morfológicas e dessa forma prejudicar maturação das larvas e etapas posteriores em pupas e moscas adultas (LIMA, R.R., 2007). Era esperado que essas alterações também ocorressem em *D. melanogaster* expostas ao *crack* visto que essa é derivada da cocaína (Figura 4).

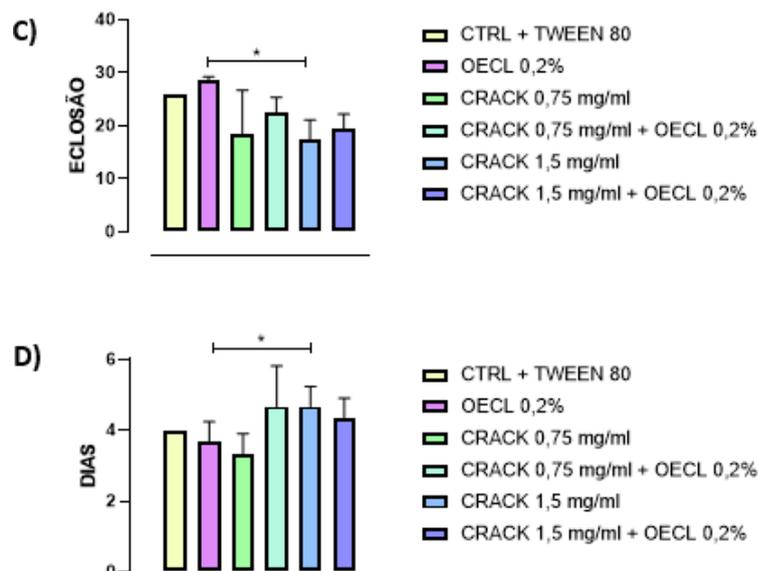


Figura 4 : Eclosão de *Drosophila melanogaster* após exposição ao *crack* e óleo essencial de *C.limon*. **C** número de eclosões. E em **D** tempo de eclosão em dias. $^{**}p < 0,05$; $^{***}p < 0,001$. Valores expressam a média +/- erro padrão da média das medidas obtidas nas triplicatas. ANOVA one-way, pós- teste Tukey. Fonte: Autor

Em **C** houve uma diminuição no número de eclosões nas concentrações de 0,75 mg/ml e 1,5 mg/ml de *crack* em relação as concentrações de 0,75mg/ml e 1,5 mg/ml de *crack* + OECL 0,2% respectivamente e uma diminuição significativa na contagem de eclosões do grupo 1,5 mg/ml em relação ao grupo tratado, apenas, com OECL 0,2%. E em **D** foi observado um aumento significativo no tempo de eclosão de 50% das larvas expostas as concentrações de 0,75mg/ml e 1,5mg/ml de *crack*. Os resultados se mostram promissores, uma vez que visto que as *D. melanogaster* expostas ao *crack* e tratadas com OECL apresentaram um aumento quanto ao número de pupas e eclosões sugerindo um efeito neuroprotetor mediado por OECL

Os dados coletados corroboram com estudos que já mostram a toxicidade da cocaína no período de desenvolvimento e seus efeitos nas moscas, assim como em ratos, camundongos, zebrafish e humanos, por meio de mecanismos neurais, mostrando a sensibilidade das moscas frente a drogas psicoativas (HIGHFILL, 2019). Além disso, os efeitos positivos do OECL, que assim como outros óleos cítricos em baixas concentrações não apresentam toxicidade para as *Drosophila* e ainda possuem propriedades benéficas para o desenvolvimento cerebral (SILVA, 2020).

4.3 Efeitos da exposição do crack e do OECL no rastejamento larval de *Drosophila melanogaster*

No teste de rastejamento larval (Figura 5 e Figura 6) foi observado a porcentagem de mobilidade realizada pela larva durante um período de 1 min. Nos resultados demonstraram uma mobilidade aumentada nos grupos expostos ao *crack*, na concentração de 0,75mg/ml, quando comparados ao grupo CTRL.

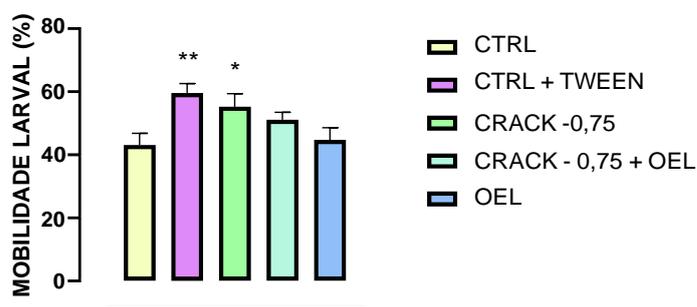


Figura 5: Análise da distância calculada usando o número de cruzamentos x 0,5cm. Resultados expressos \pm E.P.M. ANOVA one way, pós-teste Tukey. * Diferença significativa em relação ao grupo Controle; **** Diferença significativa em relação aos demais grupos ($p < 0,0001$).

Na literatura, estudos indicam que a excitação e a motilidade tendem a aumentar em moscas adultas ao serem expostas a condições experimentais na presença de dopamina ou de substâncias que promovam o aumento da atividade desse neurotransmissor (LEBESTKY et al., 2009). Isso se deve ao fato de que a dopamina, um neurotransmissor da classe das monoaminas, apresenta a capacidade de modular várias redes neurais diferentes e assim influenciar na regulação de diferentes classes como comportamento e funções executivas (FERREIRA, K, et al., 2012). Características como a quimioatração dependente de dopamina, e a capacidade de sensibilização dessa espécie à cocaína (substância base para o *crack*), fazem da *Drosophila* um importante modelo alternativo para o estudo do impacto neurofisiológico dessa droga (ABOLAJI et al., 2013; SHIBUYA et al., 2021). Sobre a sensibilização à cocaína, esta diz respeito à capacidade do animal apresentar resposta à estimulação causada pelo contato com a cocaína. A cocaína age se ligando aos transportadores dopaminérgicos de membrana (DAT), e bloqueando-os. Os DAT são responsáveis pela recepção da dopamina liberada na fenda sináptica; com seu bloqueio pela cocaína, promove-se, como consequência, o aumento dos níveis de dopamina na fenda sináptica, potencializando, assim, a ação dessa monoamina. Uma das principais consequências da ação da cocaína é o aumento dos níveis locomotores do organismo, juntamente com a ocorrência de comportamentos

classificados como estereotipados (HEBERLEIN et al., 2009).

O resultado (figura 5) apresenta um padrão de aumento na motilidade de larvas expostas a concentração de 0,75 de *crack*, bem como uma diminuição no grupo exposto a essa mesma concentração de *crack*, porém acrescido de OECL, de modo que reforça os achados na literatura.

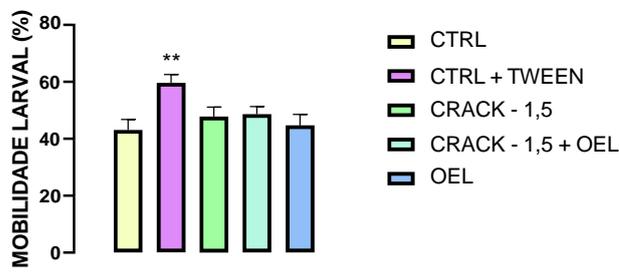


Figura 6: Análise do período de imobilidade calculada usando o número de cruzamentos x 0,5cm. Resultados expressos \pm E.P.M. ANOVA one way, pós-teste Tukey. * Diferença significativa em relação ao grupo Controle.

Sabe-se também que as mudanças em comportamento apresentam a capacidade de alterar de acordo com a quantidade de droga, podendo apresentar de alta motilidade a acinesia (HEBERLEIN, et al., 2009). Dada essa importância, pôde-se observar uma redução de motilidade nos grupos expostos a uma concentração de *crack* maior (1,5mg/ml) quando comparada ao grupo exposto a concentração de 0,75mg/ml (Figura 6), o que reforça os achados. Além disso, larvas com meio acrescido de OECL não apresentaram diferença significativa de motilidade ao serem comparadas com o grupo controle, assim ressalta não haver interferência negativa no uso do óleo na concentração escolhida.

4.4 Efeitos da exposição do crack e do OECL na locomoção de *Drosophila melanogaster*

Na avaliação em campo aberto, os resultados exprimem que moscas adultas expostas ao *crack* (1,5mg/ml) tiveram uma diminuição significativa em distância percorrida (Figura 7) quando comparadas ao grupo controle e que este efeito sofreu modificação pelo tratamento concomitante com OECL. Nesse teste, não houve diferença significativa entre o grupo OECL em relação ao CTRL.

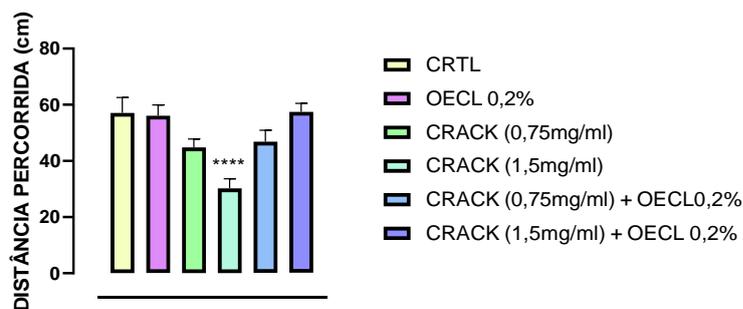


Figura 7: Arenas em placa de petri. Há maior exploração pelos grupos controle e grupos expostos a OECL. Diferenças significativas entre a porcentagem média de distância percorrida no grupo *crack* 1,5mg/ml aos grupos CTRL****, OECL 0,2% ***($p < 0,0001$). Para cada arena $n = 15$

Os experimentos da locomoção foram realizados em virtude da premissa de que o *crack* altera a atividade locomotora dos animais pelo uso agudo ou crônico (HIRTH, 2010). A avaliação de comportamento permite observar uma sensibilização das moscas ao psicoestimulante, o que pode promover uma alteração parcial ou total na capacidade de movimentação de moscas (BAITON, R. et al., 2000).

Os achados na literatura que trazem a abordagem do efeito de *crack* na locomoção de moscas ainda são em números bem reduzidos. No entanto, é possível encontrar estudos que utilizam cocaína associado ao risco de maior neurotoxicidade em moscas, o que acarreta alterações motoras e cognitivas capazes de serem detectadas em testes de locomoção como o teste de campo aberto (ROTHENFLUH, A., 2002; BAITON, R. et al., 2000). A partir do avanço nesses estudos, novos questionamentos surgiram acerca da influência de cocaína na locomoção de moscas, mas dessa vez questionava-se a dose-dependência. Observou-se que em baixas doses é possível observar um aumento na locomoção ao passo que altas doses podem não levar a uma elevação de locomoção, como também, uma diminuição desse comportamento (FILOŠEVIC; AL-SAMARAI; WALDOWSKI, 2018). Essa observação revela que há uma relação não linear entre locomoção e sensibilização a cocaína.

Em consonância com os descritos, foi possível observar uma diminuição na locomoção de moscas do grupo *crack* 1,5mg/ml quando comparadas ao grupo 0,75mg/ml. Outros estudos demonstraram que após a primeira exposição à cocaína as moscas apresentaram hiperatividade locomotora seguida de sedação, porém após administração

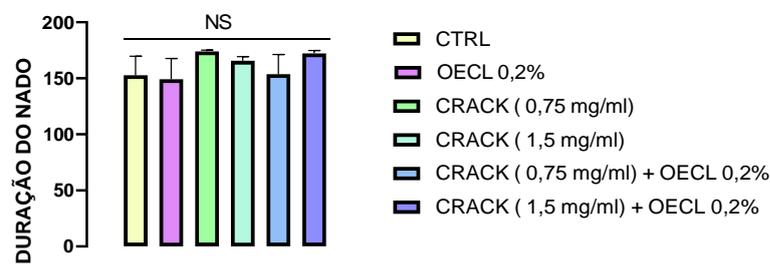
de uma segunda dose o animal apresentava diminuição da resposta locomotora, sugerindo o fenômeno de tolerância, no qual o animal não mais responde aos estímulos, necessitando de doses cada vez maiores para o mesmo efeito locomotor (ATKINSON, 2010).

Em modelo de *D. melanogaster*, a utilização de OECL resultou na melhora significativa do padrão comportamental como também parâmetros bioquímicos (OYELEYE, S, et al., 2021). Enquanto que em ratos o uso de compostos com maior presença de OECL foi capaz de reverter déficits de memória pela redução de estresse oxidativo associado a efeitos inibitórios da colinesterase (OYELEYE, S, et al., 2021). O resultado desses achados em diferentes espécies são indicativos do potencial neuprotetor a ser explorado de OECL. Conforme já mencionado, o presente estudo tem um padrão de melhora no comportamento de ambos os grupos OECL+*crack*, na avaliação de distância percorrida no teste arena de campo aberto é notório o aumento de atividade realizada por estes grupos indicando assim uma capacidade de amenizar efeitos negativos provocados pelo *crack*.

4.5 Efeitos da exposição do crack e do OECL no comportamento do tipo depressivo de *Drosophila melanogaster*

Não foram observadas alterações significativas na latência para imobilidade (Figura 8A) e duração da imobilidade (Figura 8B) nos grupos expostos ao crack e/ou OECL, em relação ao grupo CRTL.

A)



B)

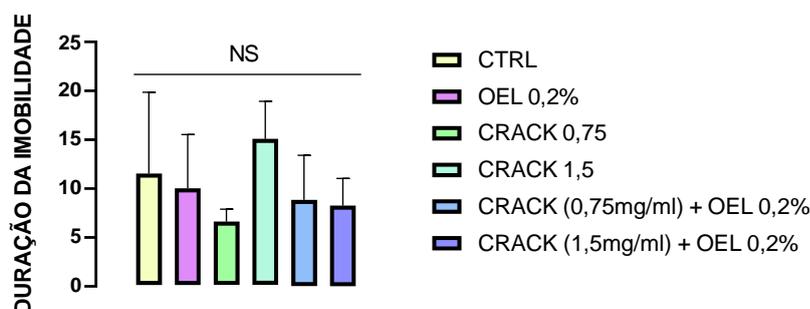


Figura 8: Avaliação da Em A Padronização do tempo de nado. Não ocorre diferença do tempo de nado entre os grupos experimentais. A significância foi determinada por ANOVAs one-way seguido pelo pós-teste de Tukey (Graphpad Prism). NS=sem relevância estatística. E em B Teste de imobilidade ressaltando que não há expressão do comportamento tipo-depressivo entre os grupos analisados. A significância foi determinada por ANOVAs one-way seguido pelo pós-teste de Tukey Graphpad Prism). NS=sem relevância estatística.

O TNF tem sido amplamente utilizado para estimar a eficácia de substâncias antidepressivas em roedores, porém recentemente foi adaptado para *Drosophila*. Essa adaptação foi realizada visto que essa espécie possui um sistema de neurotransmissores semelhantes ao de mamíferos bem como muitas de suas estruturas cerebrais são envolvidas em comportamentos semelhantes (HIBICKE, M., 2022).

O TNF é ainda comumente utilizado para medir a capacidade de responder adversidades inescapáveis, em que o comportamento passivo (imobilidade) é encarado como um comportamento do tipo depressivo, enquanto a redução de imobilidade é considerada um efeito antidepressivo (HAO C, et al., 2013). Embora os resultados não expressem estatísticas significativas na latência de imobilidade, é possível notar uma tendência de aumento do tempo de imobilidade para o grupo exposto a concentração mais alta de *crack* (1,5mg/ml), assim

como também é possível notar uma tendência para diminuição de latência para o grupo exposto a 0,75mg/ml de *crack*.

Hibicke M. (2022) relata que a resposta locomotora de *Drosophila* ao TNF depende de variáveis como sexo, substâncias administradas e quantidade de doses. Além disso, essa metodologia adaptada ainda apresenta controvérsias no resultado de seus comportamentos e neurocircuitos envolvidos (HIBICKE, M.,2022). No entanto, o TNF em *Drosophila* tem como benefício auxiliar na definição de quais são as modulações genéticas comportamentais de relevância, bem como elucidar mecanismos envolvidos nas mudanças de comportamento específicas, isso se deve ao fato de que esse gênero permite maiores modulações genéticas com custos reduzidos (RASTI A. et al., 2021).

5. CONCLUSÃO

O estudo do impacto de drogas de abuso vem se expandindo e o modelo animal de *Drosophila* se destaca como um promissor para esse fim, dada a capacidade de sensibilização comportamental destes animais à cocaína. A demonstração de mudanças nos comportamentos (passíveis de quantificação da frequência, intensidade ou tipo de movimento), os quais são induzidos por repetidas exposições à droga de abuso como o *crack* podem mimetizar o que acontece com pacientes usuários de tais substâncias. Dados da literatura relacionam também que doses de óleos essenciais tem potencial de toxicidade para insetos como moscas. Nesse sentido, nossos resultados demonstraram a utilização da dose de 0,2% do OECL como sendo não tóxica em *D. melanogaster* e passível de utilização em ensaios futuros neste modelo animal.

As alterações da locomoção de *D. melanogaster* após a exposição ao *crack* corroboram com a hipótese de sensibilização não dependente de doses desta substância psicoestimulante, bem como o uso de OECL associado ao *crack* demonstram efeitos promissores diante da capacidade de atenuar efeitos de hiperlocomoção e mesmo desenvolvimento, o que revela a importância da investigação de substâncias naturais na atenuação dos efeitos adversos de drogas de abuso. Com isso, no futuro, a utilização de substâncias naturais pode ser incluída no tratamento de pacientes usuários de substâncias psicoestimulantes.

REFERÊNCIAS

- ABOLAJI, A. et al. *Drosophila melanogaster* as a Promising Model Organism in Toxicological Studies: A Mini Review Ameliorative Properties of Citrus Bioflavonoids on 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD)-induced reprotoxicity View project Nigerian *Drosophila* Research Community V. **Archives of Basic and Applied Medicine**, v.1, p.33–38, 2013;
- BAINTON, Roland J. et al. Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in *Drosophila*. **Current Biology**, v. 10, n. 4, p. 187-194, 2000;
- BUCHHOLZ, J.; SAXON, A. J. Medications to treat cocaine use disorders. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 32, n. 4, p. 275–281, jul. 2019;
- CASTRO NETO, A.G., Figueiroa, m.s., almeida, r.b.f., rameh-de-albuquerque, r.c., moura, i.s.g. Nappo, s.a. Cocaine and Its Variations in Forms of Presentation and Addiction. Psychopathology - **An International and Interdisciplinary Perspective**. (2020);
- DEBAT, Vincent et al. Developmental stability: a major role for cyclin G in *Drosophila melanogaster*. **PLoS genetics**, v. 7, n. 10, p. e1002314, 2011;
- DE NOBREGA, Aliza K.; LYONS, Lisa C. *Drosophila*: An emergent model for delineating interactions between the circadian clock and drugs of abuse. **Neural Plasticity**, v. 2017, 2017.
- DE RÉ, F. C. et al. Characterization of the complete mitochondrial genome of flower-breeding *Drosophila incompta* (Diptera, Drosophilidae). **Genetica**, v. 142, n. 6, p. 525-535, 2014;
- DEVINENI, A. V.; HEBERLEIN, U. Preferential Ethanol Consumption in *Drosophila* Models Features of Addiction. **Current Biology**, v. 19, n. 24, p. 2126-2132, 2009;
- FERREIRA, KAMILA FERNANDES; RIBEIRO, SABLINY CARREIRO; BARRETO, LUIS GONZALO GOMEZ. O PRAZER DO CRACK. **Simpósio Internacional de Neurociências da Grande Dourados**, 2012;
- FOLTIN, Richard W.; FISCHMAN, Marian W. Ethanol and cocaine interactions in humans: cardiovascular consequences. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 31, n. 4, p. 877-883, 1988;
- FILOŠEVIĆ, Ana; AL-SAMARAI, Sabina; ANDRETIĆ WALDOWSKI, Rozi. High throughput measurement of locomotor sensitization to volatilized cocaine in *Drosophila melanogaster*. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 11, p. 25, 2018;
- GÓMEZ, Ivana M. et al. Inhalation of marijuana affects *Drosophila* heart function. **Biology open**, v. 8, n. 8, p. bio044081, 2019;

- HANLON, C. A. et al. Loss of laterality in chronic cocaine users: An fMRI investigation of sensorimotor control. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 181, n. 1, p. 15–23, jan. 2010;
- HAO, Cherng-Wei et al. Antidepressant-like effect of lemon essential oil is through a modulation in the levels of norepinephrine, dopamine, and serotonin in mice: Use of the tail suspension test. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 370-379, 2013;
- HEBERLEIN, U. et al. *Drosophila*, a genetic model system to study cocaine-related behaviors: A review with focus on LIM-only proteins. **Neuropharmacology**, v. 56, n. SUPPL. 1, p. 97–106, 2009;
- HIRTH, Frank. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 9, n. 4, p. 504-523, 2010;
- HIBICKE, M.; NICHOLS, C. D. Validation of the forced swim test in *Drosophila*, and its use to demonstrate psilocybin has long-lasting antidepressant-like effects in flies. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2022;
- HIGHFILL, Chad A. et al. Genetics of cocaine and methamphetamine consumption and preference in *Drosophila melanogaster*. **PLoS genetics**, v. 15, n. 5, p. e1007834, 2019;
- IDAOMAR, M. et al. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 513, n. 1-2, p. 61-68, 2002;
- JOHNSON, C. E. **Effect of Inhaled Lemon Essential Oil on Cognitive Test Anxiety Among Nursing Students**. *Holistic Nursing Practice*, v. 33, n. 2, p. 95–100, 2019;
- KESSLER, Felix; PECHANASKY, Flavio. Uma visão psiquiátrica sobre o fenômeno do crack na atualidade. **Revista de psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, p. 96-98, 2008;
- KEUNG, Wing-Ming; VALLEE, Bert L. Daidzin and daidzein suppress free-choice ethanol intake by Syrian golden hamsters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 21, p. 10008-10012, 1993;
- KHURANA, Sukant; LI, Wen-Ke; ATKINSON, Nigel S. Image enhancement for tracking the translucent larvae of *Drosophila melanogaster*. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15259, 2010;
- KULKARNI, S. K.; NINAN, I. **Inhibition of morphine tolerance and dependence by *Withania somnifera* in mice**. *Journal of ethnopharmacology*, v. 57, n. 3, p. 213–7, ago. 1997;
- LEBESTKY, Tim et al. Two different forms of arousal in *Drosophila* are oppositely regulated by the dopamine D1 receptor ortholog DopR via distinct neural circuits. **Neuron**, v. 64, n. 4, p. 522-536, 2009;

- LIMA, Rafael Rodrigues et al. Degeneração neuronal secundária e excitotoxicidade. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 1, p. 27-31, 2007;
- MACDONALD, Stuart J.; HIGHFILL, Chad A. A naturally-occurring 22-bp coding deletion in Ugt86Dd reduces nicotine resistance in *Drosophila melanogaster*. **BMC research notes**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2020;
- MEYER, G. Dale; NECK, Heidi M.; MEEKS, Michael D. The entrepreneurship-strategic management interface. **Strategic entrepreneurship: Creating a new mindset**, p. 17-44, 2017;
- MIHAJLOV-KRSTEV, Tatjana et al. Antimicrobial, antioxidative, and insect repellent effects of Artemisia absinthium essential oil. **Planta medica**, v. 80, n. 18, p. 1698-1705, 2014;
- OBOH, G.; OLASEHINDE, T. A.; ADEMOSUN, A. O. **Essential Oil from Lemon Peels Inhibit Key Enzymes Linked to Neurodegenerative Conditions and Pro-oxidant Induced Lipid Peroxidation**. *Journal of Oleo Science*, v. 63, n. 4, p. 373–381, 2014;
- ODAGIRI, Kei et al. Psychological prenatal stress reduced the number of BrdU immunopositive cells in the dorsal hippocampus without affecting the open field behavior of male and female rats at one month of age. **Neuroscience letters**, v. 446, n. 1, p. 25-29, 2008;
- OGUNSUYI, Opeyemi B. et al. Effect of Solanum vegetables on memory index, redox status, and expressions of critical neural genes in *Drosophila melanogaster* model of memory impairment. **Metabolic Brain Disease**, v. 37, n. 3, p. 729-741, 2022;
- OYELEYE, Sunday Idowu et al. Citrus spp. essential oils improve behavioral pattern, repressed cholinesterases and monoamine oxidase activities, and production of reactive species in fruit fly (*Drosophila melanogaster*) model of Alzheimer's Disease. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. e13558, 2021;
- PAIVA, C. B. et al. **Depression, anxiety, hopelessness and quality of life in users of cocaine/crack in outpatient treatment**. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*, v. 39, n. 1, p. 34–42, mar. 2017;
- PENETAR, D. M. et al. **A single dose of kudzu extract reduces alcohol consumption in a binge drinking paradigm**. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 153, p. 194–200, ago. 2015;
- PETIT-DEMOULIERE, Benoit; CHENU, Franck; BOURIN, Michel. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 177, n. 3, p. 245-255, 2005;
- PETRUCCELLI, Emily et al. Alcohol causes lasting differential transcription in *Drosophila* mushroom body neurons. **Genetics**, v. 215, n. 1, p. 103-116, 2020;
- PHILIPSEN, Mai Hoang et al. Interplay between cocaine, drug removal, and methylphenidate reversal on phospholipid alterations in *Drosophila* brain determined by imaging mass spectrometry. **ACS chemical neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 806-813, 2020;

- PRATTA, Elisângela Maria Machado; SANTOS, Manoel Antonio dos. O processo saúde-doença e a dependência química: interfaces e evolução. **Psicologia: Teoria e pesquisa**, v. 25, p. 203-211, 2009;
- PUCHERIO, G. et al. *Crack- Da pedra ao tratamento*. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, v.54, n.3, p.337-343, jul./set. 2010;
- RASTI, Aryana R. et al. Pharmacological characterization of the forced swim test in *Drosophila melanogaster*. **Invertebrate Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 1-8, 2020;
- ROTHENFLUH, Adrian; HEBERLEIN, Ulrike. Drugs, flies, and videotape: the effects of ethanol and cocaine on *Drosophila* locomotion. **Current opinion in neurobiology**, v. 12, n. 6, p. 639-645, 2002;
- SILVA, Bruna Cássia; OLIVEIRA, Rosiane Gomes Silva; VASCONCELOS, Mirley Alves. Efeito modulador do óleo essencial do limão Taiti (*Citrus latifolia*) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 1, p. 72-77, 2020
- SHIBUYA, T. et al. Dopamine modulation of chemotactic behavior in response to natural aroma substances in *Drosophila melanogaster* larvae. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 1, p. 100007, 2021;
- United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report 2018**;UNODC publications.2018;
- UPADHYA, Dinesh et al. Prospects of cannabidiol for easing status epilepticus-induced epileptogenesis and related comorbidities. **Molecular neurobiology**, v. 55, n. 8, p. 6956-6964, 2018;
- WILLARD, S. S. et al. Chronic cocaine exposure in *Drosophila*: Life, cell death and oogenesis. **Developmental Biology**. V 296. P. 150-163. 2006;
- YAZGAN, H.; OZOGUL, Y.; KULEY, E. **Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria**. International journal of food microbiology, v. 306, p. 108266, 2 out. 2019;
- ZHANG, Liang-Liang et al. Influence of drying methods on chemical compositions, antioxidant and antibacterial activity of essential oil from lemon peel. **Natural product research**, v. 32, n. 10, p. 1184-1188, 2018;