

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN SILICO* E *IN VITRO* DO MONOTERPENO CITRAL

Camilla Pinheiro de Menezes CALDAS¹

Janiere Pereira de SOUSA²

Ana Luíza Alves de Lima PÉREZ³

Jéssyca Marina Carneiro Gomes dos SANTOS⁴

Heloísa Mara Batista Fernandes de OLIVEIRA⁵

Abrahão Alves de OLIVEIRA FILHO⁶

Edeltrudes de Oliveira LIMA⁷

1. Doutoranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil. E-mail: camilla.farmaufpb@gmail.com
2. Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil. E-mail: janiereps@yahoo.com.br
3. Mestre em Odontologia pela Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil. E-mail: analuiza_perez@yahoo.com.br
4. Graduada em Farmácia pela Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil. E-mail: jessygomes_13@hotmail.com
5. Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba e Farmacêutica-Bioquímica do Hospital Ana Bezerra-UFRN. E-mail: heloisambf@gmail.com
6. Professor da Universidade Federal de Campina Grande, Doutor em Farmacologia. E-mail: abrahão.farm@gmail.com
7. Orientadora e Professora da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil. E-mail: edelolima@yahoo.com.br

Recebido em: 11/07/2016 - Aprovado em: 16/10/2016 - Disponibilizado em: 18/12/2016

RESUMO

Introdução: as pesquisas com monoterpenos têm aumentado com a necessidade de novas ferramentas terapêuticas para o combate das infecções fúngicas oportunistas, como as causadas pelos fungos dematiáceos pertencentes ao gênero *Cladosporium*. **Objetivo:** avaliar o potencial antifúngico do monoterpeno citral. **Métodos:** a determinação da CIM (Concentração inibitória mínima) das substâncias, foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo. Utilizou-se duas cepas de *C. oxysporum* e duas cepas de *C. sphaerospermum*. Todas as cepas de micro-organismos utilizados neste estudo fazem parte da Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Foi realizado controle de viabilidade das cepas ensaiadas, e também controle de sensibilidade destas cepas frente à ação de antimicrobianos considerados padrões na utilização clínica. **Resultados:** pode-se observar que todos os compostos avaliados apresentaram uma CIM₅₀ (Concentração Inibitória Mínima para 50% das cepas testadas) de 128 µg/mL para as cepas fúngicas testadas. **Conclusão:** conclui-se que o monoterpeno citral pode se tornar uma alternativa para o tratamento de infecções fúngicas causadas por cepas de *Cladosporium*. **Palavras-chave:** antifúngico; monoterpeno; citral; *Cladosporium oxysporum*; *Cladosporium sphaerospermum*.

ANTIFUNGAL ACTIVITY *IN SILICO* AND *IN VITRO* OF CITRAL MONOTERPENE

ABSTRACT

Introduction: research with monoterpenes have increased the need for new therapeutic tools to combat opportunistic fungal infections such as those caused by fungi dematiaceous belonging to the *Cladosporium* genus. **Objective:** To

evaluate the antifungal potential of citral monoterpene. **Methods:** The determination of the MIC (minimum inhibitory concentration) of the substance was performed using microdilution broth technique. We used two strains of *C. oxysporum* and two strains of *C. sphaerospermum*. All the strains of microorganisms used in this study are part of URM Culture Collection of the Department of Mycology, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco. Control was carried viability of the tested strains, and also control sensitivity of these strains opposite antimicrobial action patterns considered in the clinical use. **Results:** It can be seen that all the compounds evaluated showed a MIC₅₀ (Minimum Inhibitory Concentration for 50% of tested strains) to 128 µg/mL for the tested fungal strains. **Conclusion:** It was concluded that citral monoterpene can become an alternative for the treatment of fungal infections caused by strains of *Cladosporium*.

Keywords: antifungal; monoterpene; citral; *Cladosporium oxysporum*, *Cladosporium sphaerospermum*.

INTRODUÇÃO

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos. Os primeiros, denominados metabólitos primários ou macromoléculas, são essenciais a todos os seres vivos, e o segundo grupo de compostos químicos – os metabólitos secundários ou micromoléculas – que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas e, diferentemente daqueles do metabolismo primário, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas (POSER, MENTZ, 2004).

Os metabólitos secundários apresentam várias atividades biológicas. Muitos são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e de perfumaria, entre outras. Entre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com atividade biológica são os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (PEREIRA, 2006). Quimicamente, a maioria dos óleos

essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos os mais frequentes (SIMÕES, SPITZER, 2004).

Dentre os monoterpenos relatados na literatura destaca-se o citral, um monoterpene acíclico natural, citral está presente no óleo essencial de várias espécies de plantas, incluindo limão e laranja (FISHER, PHILLIPS, 2008). E é o principal componente do óleo de *Melissa officinalis* pertencente à família *Lamiaceae* (SADDIQ, KHAYYAT, 2010). O citral é um monoterpene com conhecidas propriedades farmacológicas, como: anti-tumoral (FARAH et al., 2010; CHAOUKI et al., 2009; XIA et al., 2013; DUDAI et al., 2005), broncodilatador (MANGPRAYOOL, KUPITTAYANANT, CHUDAPONGSE, 2013), inseticida (ABRAMSON, ALDAMA, SULBARAN, 2007) e antimicrobiana (SOMOLINOS et al., 2009; BELDA-GALBIS et al., 2013).

O gênero *Cladosporium* abrange muitas espécies de fungos contaminantes e oportunistas dematiáceos que são

encontrados ubiqüamente como saprófitas no solo e em materiais em decomposição (SCHUBERT, 2005).

As espécies *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *C. oxysporum*, *C. carrionii* e *C. sphaerospermum* têm sido observadas como responsáveis primárias por quadro de feohifomicoses superficiais (onicomicoses, ceratites, etc.), cromoblastomicoses e feohifomicoses profundas (meningites, quadro pulmonares, etc.) (DE HOOG et al., 2000; KWON-CHUNG, SCHWARTZ, RYBAK, 1975; NAMRATHA et al., 2010; CORREIA et al., 2010).

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar *in silico* e *in vitro* o potencial antifúngico do monoterpeno citral contra cepas de *C. oxysporum* e *C. sphaerospermum*.

MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), no período de maio de 2015 a junho de 2016.

CEPAS FÚNGICAS

Para realização dos ensaios de atividade antifúngica *in vitro* foram selecionadas 2 cepas de *C. oxysporum* (

URM 5412 e URM 6056) e 2 cepas de *C. sphaerospermum* (URM 5350 e URM 5455) pertencentes à coleção de culturas da Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Todas as cepas foram mantidas em Ágar Sabouraud Dextrose – ASD inclinado (DIFCO Laboratories Ltda, USA) a temperatura ambiente (28 °C) e sob refrigeração (4 °C).

Foi utilizado um inóculo fúngico de aproximadamente $1 - 5 \times 10^6$ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (CLEELAND, SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000; CLSI, 2002).

MEIOS DE CULTURA

Foram utilizados os meios ágar Sabouraud dextrose (ASD) e caldo Sabouraud dextrose (CSD) obtidos da Difco Laboratories (Detroit, MI, EUA) e RPMI-1640-L-glutamina (sem bicarbonato de sódio) da Sigma-Aldrich® (São Paulo, SP, Brasil), preparados conforme as instruções do fabricante.

MONOTERPENO E ANTIFÚNGICOS

O monoterpeno (citral) e os antifúngicos (anfotericina B e voriconazol) foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. As emulsões, nas diferentes concentrações, foram preparadas no momento de execução dos ensaios, dissolvendo-os primeiramente

em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5% e Tween 80 (Sigma-Aldrich®) a 2%, e utilizando água destilada estéril para alcançar a concentração desejada.

PASS ON LINE

Previsão do espectro de atividade para substâncias (PASS) online (<http://www.way2drug.com/passonline>) é um software destinado para avaliar o potencial biológico geral de uma molécula orgânica sobre o organismo humano. Este programa fornece previsões simultâneas de muitos tipos de atividades biológicas com base na estrutura dos compostos orgânicos. O espectro de atividade biológica de um composto químico é o conjunto de diferentes tipos de atividade biológica, que refletem os resultados de interação do composto com várias entidades biológicas. *Pass online* dá várias facetas da ação biológica de um composto, obtendo os índices Pa (probabilidade "de ser ativo") e Pi (probabilidade "de ser inativo") estimando a categorização de um composto potencial em ser pertencente à subclasse de compostos ativos ou inativos, respectivamente (SRINIVAS et al., 2014).

PASS oferece previsões com base na probabilidade de novos efeitos e mecanismos de ação com espectro de atividade requerido entre os compostos a partir de bases de dados internas, antigas e comerciais. *Pass online* prevê o espectro de atividade biológica para as impressões

modificadas, com base em sua fórmula estrutural, juntamente com diferentes descritores como antifúngica, antiviral, anti-helmíntico, antiprotozoários, etc., por isso, é possível estimar se os novos compostos têm um efeito particular (SRINIVAS et al., 2014).

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A concentração inibitória mínima do citral, bem como dos antifúngicos anfotericina B e voriconazol foi determinada pela técnica da microdiluição em caldo CLEELAND, SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000; CLSI, 2002; Eloff, 1998). Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL de RPMI-1640 duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da emulsão dos produtos, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 0,5 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa se encontra a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL das espécies nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Paralelamente, foi realizado controle de viabilidade das cepas ensaiadas (100 µL do mesmo RPMI-1640 duplamente concentrado e 10 µL do inóculo de cada cepa). E para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos agentes emulsificantes utilizados na solubilização do monoterpeno, foi feito um controle no qual foi colocado nas cavidades 100 µL do RPMI-1640, DMSO (0,5%), Tween 80 (2%) e 10 µL da suspensão. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, colocando-se 100 µL do RPMI-1640 em cavidades sem a suspensão fúngica.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 28 °C por 5-7 dias para a realização da leitura. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico visualmente verificado nos orifícios quando comparado com o crescimento controle. Os ensaios foram realizados em triplicata e a média geométrica foi calculada.

RESULTADOS

A análise dos valores de “Pa” no estudo *in silico* do citral revela que este monoterpeno apresenta uma probabilidade de atividades farmacológicas anti-infecciosa, em especial, atividade antifúngica (Pa=0,429 e Pi= 0,044) (Tabela 1).

Tabela 1- Valores de Pa e Pi para o monoterpeno citral.

Valor de Pa	Valor de Pi	Atividades farmacológicas
0,395	0,005	Antiviral (CMV)
0,340	0,066	Antiviral (Herpes)
0,281	0,103	Antiviral (Influenza)
0,363	0,143	Antiviral (Picornavirus)
0,228	0,120	Antiviral (Poxvirus)
0,735	0,002	Antiviral (Rhinovirus)
0,233	0,081	Antiprotozoal
0,235	0,129	Antiprotozoal (Coccidial)
0,335	0,079	Antiprotozoal (Leishmania)
0,230	0,035	Antiprotozoal (Plasmodium)
0,194	0,068	Antiprotozoal (Toxoplasma)
0,353	0,060	Antiprotozoal (Trypanosoma)
0,421	0,014	Antihelmíntico
0,136	0,126	Antihelmíntico (Fasciola)
0,260	0,150	Antihelmíntico (Nematodes)
0,429	0,044	Antifúngico
0,377	0,036	Antibacteriano

Fonte: SANTOS, JMCG

Observando os valores da CIM (Concentração Inibitória Mínima) do citral para as cepas de *C. oxysporum* e *C. sphaerospermum* pode-se perceber que o composto testado apresenta uma CIM de 128 µg/mL para três cepas avaliadas (*C. oxysporum* URM 6056 e URM 5412, *C. sphaerospermum* URM 5350) e de 256 µg/mL para uma das cepas testadas (*C. sphaerospermum* URM 5455). Além disso, observa-se que os antifúngicos padrões, voriconazol e anfotericina B, foram também capazes de inibir o crescimento fúngico, exceto para a cepa *C. oxysporum* URM 6056, que foi resistente a maior concentração testada (1024 µg/mL) dos dois antifúngicos padrão (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados da CIM do citral, voriconazol e anfotericina B contra *C. oxysporum* e *C. sphaerospermum*

Cepas de <i>Cladosporium</i>	Citral (µg/mL)	Voriconazol (µg/mL)	Anfotericina B (µg/mL)	*C
	CIM	CIM	CIM	
<i>C. oxysporum</i> URM 6056	128	>1024	>1024	+
<i>C. oxysporum</i> URM 5412	128	8	16	+
<i>C. sphaerospermum</i> URM 5350	128	16	64	+
<i>C. sphaerospermum</i> URM 5455	256	16	16	+

Fonte: SANTOS, JMCG

*C - Controle de crescimento do micro-organismo em RPMI-1640, DMSO (0,5%) e Tween 80 (2%), sem monoterpeno ou antifúngicos.

DISCUSSÃO

Os terpenos são constituintes que fazem parte da composição dos óleos essenciais, que por sua vez são empregados na indústria na produção de perfumes e cosméticos, além de apresentarem efeitos farmacológicos (EDRIS, 2007).

Diferentes testes têm sido utilizados para avaliar as propriedades farmacológicas das substâncias. Neste contexto, destacam-se os testes que utilizam os modelos *in silico* (expressão usada com o significado de “executado em computador”), que são rápidos, reprodutíveis e normalmente baseados em biorreguladores humanos, garantindo assim a segurança para a utilização do produto natural como um futuro fármaco (ANGELO, MAX, MARKUS et al., 2006; SRINIVAS et al., 2014). Neste estudo, a análise *in silico* do monoterpeno citral demonstrou várias promissoras atividades farmacológicas desta substância contra

diferentes agentes infecciosos, em especial os fungos.

Estes dados computacionais, por sua vez, foram confirmados com o estudo *in vitro* frente a diferentes cepas de *C. oxysporum* e *C. sphaerospermum*, contra as quais o monoterpeno testado apresentou valores de CIM de 128 e 256 µg/mL.

De acordo com Aligianis et al. (2001) e Sartoratto et al. (2004), produtos com CIM até 500 µg/mL são considerados com forte poder antimicrobiano; produtos com CIM entre 600 e 1500 µg/mL – moderado poder antimicrobiano, e produtos com CIM acima de 1500 µg/mL - fraco poder antimicrobiano. Desta forma, pode-se afirmar que o citral apresenta um forte efeito antifúngico contra as cepas de *C. oxysporum* e *C. sphaerospermum*.

Este potencial antifúngico *in silico* e *in vitro* do citral encontra-se de acordo com outros estudos que já demonstraram o potencial antimicrobiano deste composto contra outras espécies fúngicas, como por exemplo *Penicillium digitatum* (FISHER, PHILLIPS, 2008), *Trichophyton mentagrophytes* (PARK et al., 2009), *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* (LUO et al., 2004; MESA-ARANGO et al., 2009).

CONCLUSÕES

Portanto, ao analisar os dados obtidos nesta pesquisa *in silico* e *in vitro* pode-se perceber que o monoterpeno citral apresenta uma promissora atividade antimicrobiana, em especial antifúngica contra espécies de *C. oxysporum* e *C. sphaerospermum*.

REFERÊNCIAS

- Abramson CH, Aldama E, Sulbaran E. Exposure to citral, cinnamon and ruda disrupts the life cycle of a vector of Chagas disease. **Am J Environ Sci**, **3**, 7 – 8, 2007.
- Aligianis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **J Agr Food Chem**, **49(9)**, 4168-4170, 2001.
- Angelo V, Max D, Markus AL. The Challenge of Predicting Drug Toxicity *in silico*. **Bas Clin Phar Tox**, **99**, 195–208, 2006.
- Belda-Galbis CM, Pina-Pérez MC, Leufvén A, Martínez A, Rodrigo D. Impact assessment of carvacrol and citral effect on *Escherichia coli* K12 and *Listeria innocua* growth. **Food Control**, **33**, 536 – 544, 2013.
- Chaouki W, Leger DY, Liagre B, Beneytout JL, Hmamouchi M. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. **Fundam Clin Pharmacol**, **23**, 549–556, 2009.
- Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infection. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. New York: Williams & Wilkins, 1991. p. 739-787.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Method M27-A2, 2^aed. Wayne Ed. 2002; 22: 1-29.
- Correia RTM, Valente NYS, Criado PR, Martins JEC. Cromoblastomicose: relato de 27 casos e revisão da literatura. **An Bras Dermatol**, **85(4)**, 448-454, 2010.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené JL, Figueiras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus, 2000. 1126 pp.
- Dudai, N, Weinstein Y, Krup M, Rabinski T, Ofir R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. **Planta Medica**, **71**, 484–488, 2005.
- Edris AE. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytother Res**, **21(4)**, 308–323, 2007.
- Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, **64(8)**, 711-713, 1998.
- Farah IO, Trimble Q, Ndebele K, Mawson A. Retinods and citral modulated cell viability, metabolic stability, cell cycle progression and distribution in the A549 lung carcinoma cell line. **Biomed Sci Instrum**, **46**, 410–21, 2010.
- Fisher K, Phillips C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends Food Sci Technol**, **19(3)**, 156 -164, 2008.
- Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochem Anal**, **11(3)**, 137-147, 2000.
- Kwon-Chung KJ, Schwartz IS, Rybak BJ. A pulmonary fungus ball produced by

Cladosporium cladosporioides. **Am J Clin Pathol**, **64**, 564–568, 1975.

Luo M, Jiang LK, Huang YX, Xiao M, Li B, Zou GL. Effects of citral on *Aspergillus flavus* spores by quasielastic light scattering and multiplex microanalysis techniques. **Acta Biochim Biophys Sin**, **36**, 277–283, 2004.

Mangprayool T, Kupittayanant S, Chudapongse N. Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action. **Fitoterapia**, **89**, 68–73, 2013.

Mesa-Arango AC, Montiel-Ramos J, Zapata B, Durán C, Betancur-Galvis L, Stashenko E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **104(6)**, 878, 2009.

Namratha N, Nadgir S, Kale M, Rathod R. Chromoblastomycosis due to *Cladosporium carrionii*. **J Lab Physicians**, **2(1)**, 47–48, 2010.

Park MJ, Gwak KS, Yang I, Kim KW, Jeung EB, Chang JW, Choi IG. Effect of citral, eugenol, nerolidol and alpha-terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, **80**, 290–296, 2009.

Pereira AA. Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos. 2006. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

Poser GL, Mentz LA. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC. 2004; Cap. 4: 75–89.

Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira, GM, Duarte, MCT, Rehder, VLG. Composition and antimicrobial activity of

essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol**, **35(4)**, 275 – 280, 2004.

Saddiq AA, Khayyat SA. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pestic Biochem Physiol**, **98**, 89–93, 2010.

Schubert K. Morphotaxonomic revision of foliicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes). Ph.D. dissertation. Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Germany. <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/05H208/index.htm>, 2005.

Simões CMO, Spitzer V. Óleos voláteis. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC. 2004; Cap. 18: 467–495.

Srinivas N, Sandeep KS, Anusha Y, Devendra BN. In Vitro Cytotoxic Evaluation and Detoxification of Monocrotaline (Mct) Alkaloid: An In Silico Approach. *Int. Inv. J. Biochem. Bioinform*, **2(3)** 20–29, 2014. Somolinos M, García D, Condón S, Mackey B, Pagán R. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. **J Appl Microbiol**, **108**, 1928–1939, 2009.

Xia H, Liang W, Song Q, Chen X, Hong J. The in vitro study of apoptosis in NB4 cell induced by citral. **Cytotechnology**, **65**, 49–57, 2013.