Citotoxicidad de compuestos bioactivos de semillas de cítricos contra linfoblastos de leucemia L5178Y *in vitro*

Gustavo A. Castillo Herrera[1*+], Perla A. Regalado Vera[1], Jorge A. García Fajardo[1], Ana M. Puebla Pérez[2], Jorge I. Delgado Saucedo[2], Eugenia Lugo-Cervantes[1].

[1]Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C./Av. Normalistas 800 Guadalajara, Jalisco/gcastillo@ciatej.net.mx
[2]Universidad de Guadalajara (CUCEI) / Gral.Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara, Jalisco/ ivanovith@yahoo.com

* Autor que presentará trabajo.
\+ Autor a quien la correspondencia deba ser enviada: Tel.: (52)-(33)-33-45-52-00 ext. 1950; Fax: (52)-(33)-33-45-52-00 Tecnología Alimentaria, Av. Normalistas 800 Guadalajara, Jalisco

Área del Conocimiento: ***Química de productos naturales***

Resumen: En el proceso de industrialización de los cítricos se obtienen semillas como subproducto, estas contienen limonoides (triterpenoides oxigenados), quienes están relacionados con el amargor de los cítricos, además, muestran bioactividades como anticancerígenos, antivirales y antitumorales. Por lo que el objetivo de este trabajo, fue evaluar la citotoxicidad *in vitro* de extractos de semillas de *Citrus aurantifolia swingle*, *Citrus sinensis* y *Citrus reticulata* utilizando dos solventes (metanol y acetona) y dos tiempos de extracción (5 y 8 horas) sobre linfoblastos de leucemia L5178Y. Los extractos con metanol presentaron un rendimiento mayor (8,6% ± 0,44) respecto al extracto con acetona (6,2% ± 0,40), mientras que el tiempo de extracción no lo afectó. El rendimiento fue similar entre *Citrus sinensis* (6.1% ± 0.54) y *Citrus reticulata* (5,2% ± 0,6) y mayor para *Citrus aurantifolia Swingle* (11 ± 0,5%). La citotoxicidad de los extractos de *Citrus aurantifolia Swingle* no se afecta por el solvente, ni por el tiempo de extracción, mostrando una CD_{50} menor de 40µg/ml, sin embargo los extractos de *Citrus sinensis* y *Citrus reticulata* presentan una diferencia significativa en el tipo de solvente y tiempo de extracción, observándose una mayor citotoxicidad para *Citrus sinensis,* CD_{50} de 50 µg/ml, con acetona y 8 horas, y para *Citrus reticulata*, mostró mayor citotoxicidad, CD_{50} 95µg/ml, con metanol y 5 horas. Estos resultados muestran que la citotoxicidad se ve afectada por el tipo de solvente y por el tiempo de extracción para Citrus reticulate y Citrus sinensis, y no así para Citrus aurantifolia swingle.

Palabras Clave: Semillas de cítricos; Limonoides; Citotoxicidad

Abstract: Citrus fruits are an important component for human diet, proving important compounds for human health like vitamins, minerals and dietary fiber, in the citrus industrialization process , the seeds are a non-used waste and contain bioactive compounds like oxygenated triterpenoids specifically limonoids, and that occur in high

concentrations as aglycones and glucosides, this limonoids have been related with bitter principle of citrus, furthermore, showing health benefits as anticancer, antiviral, antitumoral agents. The objective of this work was evaluate the cytotoxic activity of three seeds extracts from *Citrus aurantifolia swingle, Citrus sinensis,* and *Citrus reticulate* utilizing two solvents, methanol and acetone, at two different extraction time 5 and 8 hours. Methanol had better weight yield extraction with 8.6%±0.44 respect to acetone with 6.2%±0.40, mean while extraction time shows no significance difference between 5 or 8 hours. Yield extraction due to citrus seeds was 11±0.5 % for *Citrus aurantifolia* swingle followed by *Citrus sinensis* with 6.1% ±0.54 and finally *Citrus reticulate* with 5.2%±0.6 Cytotoxic activity was evaluated from methanol and acetone extracts, solvent type and time extraction showed no significance difference for *Citrus aurantifolia* swingle cytotoxic activity with a CD50 lower than 40µg/ml, mean while acetone extracts observed better cytotoxic activity than methanol for *Citrus sinensis* with a CD50 of 50 µg/ml at 8 hours, finally for *Citrus reticulate*, methanol extract showed better cytotoxic activity than acetone with a CD50 95µg/ml at 5 hours time extraction. These results showed that cytotoxic activity was affected by solvent and time extraction for *Citrus sinensis* and *Citrus reticulate*, except to *Citrus aurantifolia* swingle, where it does not matter type of solvent used or extraction time. Assays also showed dosage response behavior and positive and negative controls were used to compare results.

Keywords: Citrus seed; Limonoids; Citotoxicity

---

1. Introducción

En México se transforman alrededor de 2,400,000 ton de cítricos anualmente; considerando que el 50% de los frutos procesados corresponden a cáscaras y semillas[1] se puede suponer que se generan aproximadamente 1,200,000 ton de subproducto al año, lo que se convierte en un problema de contaminación debido a que son muy susceptibles a sufrir deterioro microbiano y rara vez son aprovechados, y cuando se utilizan, no se explota su potencial nutracéutico debido a que solo son utilizados como alimento para ganado y compostas, aún cuando pueden ser una fuente potencial de melazas, pectinas, D-limoneno, ácido ascórbico [1,2] y limonoides [3]; además de aceites esenciales, compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos entre otros, los cuales han mostrado diversas actividades biológicas principalmente antioxidantes y microbicidas[4,5,6,7,8 y 9].

Dentro de las semillas de cítricos se ha reportado el contenido de bioactivos muy interesantes, como son los limonides, y se encuentran distribuidos en los tejidos conectivos del árbol, pero conforme el árbol crece y madura, los limonoides se distribuyen en las diferentes partes tanto del árbol como en

el fruto. [10] y dentro de la distribución de los limonoides en el fruto, la mayor cantidad se presentan en las semillas, siendo menor en cascarilla de semillas, después en el albedo, flavedo y por último en mucho menor concentración en las vesículas del jugo. Actualmente gracias a técnicas de rayos X, resonancia magnética nuclear, HPLC, etc. Se tienen identificados 39 limonoides en estado aglicona y 17 limonoides glucosilados en las diferentes especies de cítricos [11].

Los limonoides presentan actividades interesantes en el sector agroindustrial; pudiendo estar tanto en su estado glicosilado o en estado aglicona, los limonoides glicosilados, se pueden comportar como ingredientes nutracéuticos porque no resultan amargos, comparados con su estado aglicona, y una vez que se hidrolizan pueden potenciar su efecto bioactivo, lo que resulta atractivo dado a se pueden evitar o disminuir degradaciones de la actividad biológica que presumen por la molécula de glucosa; pero lo que no se puede controlar es la dosificación de los mismos, ni mucho menos la eficiencia de su hidrolisis y lo que ha dado como resultado un sin número de trabajos de investigación[12, 13 y 14].

Para la extracción de limonoides, existe una ambigüedad sobre lo tiempos y solventes a utilizar en la extracción, ya que según algunos autores [15], el acetato de etilo con un tiempo de extracción en soxhtlet por 4 hrs es recomendado, mientras que otros como Poulose [16],considera que la extracción es mejor con metanol y por un tiempo de extracción de 24 hrs, así como Schoch [17], quien recomienda también metanol pero con un menor tiempo de 12 hrs, finalmente Hasegawa [18], sugieren que la extracción de limonoides se puede realizar con diferentes solventes que van desde diclorometano, metanol o acetona, siendo esta última y por 6 hrs. la que recomiendan para obtener el mayor rendimiento de limonoides [18]. Actualmente los limonoides han cobrado una gran importancia debido a la diversidad de propiedades biológicas que presentan, especialmente actividad anticancerígena. La limonina y nomilina presentaron un efecto inhibidor de neoplastia en estomago en ratones [19], existen evidencias de inhibición de cáncer de colon, ovario y de neuroblastomas en cultivos de células cancerígenas in vitro [20], también se ha reportado la inhibición del crecimiento de células cancerígenas de mama, afectándose el receptor positivo-negativo de estrógenos con limonoides. Algunos limonoides han incluso presentado actividad antitumoral, sobre tumores en boca de hamsters [21]. Otros estudios reportan que la limonina y nomilina presentan un efecto antiviral contra el virus de VIH-1 [22]

Por lo que en este trabajo se pretende establecer una metodología confiable para la obtención de limonoides de semillas de ***Citrus sinensis*** (naranja), de ***Citrus aurantifolia swingle*** (limón

mexicano) y ***Citrus reticulata*** (mandarina) mediante solventes que presenten una actividad citotóxica importante en linfoblastos L5178Y *in vitro*.

2. Materiales y Métodos

2.1. Obtención de limonoides

Para este experimento se utilizaron semillas proveniente de una misma procesadora de ***Citrus aurantifolia swingle*** (limón mexicano) , ubicada en Tecomán, Colima durante el periodo de cosecha del 2011. La semilla se proporcionó deshidratada y molida. Mientras que las semillas de ***Citrus sinensis*** (naranja) y ***Citrus reticulata*** (mandarina) se colectaron en mercados locales, para su posterior separación, deshidratación y molienda.

Existen diferentes condiciones para la extracción de limonoides en semillas de frutos cítricos, dichas condiciones difieren una de la otra en los tiempos de residencia y en el solvente utilizado; y coinciden en desgrasar antes la semilla con hexano (C_6H_{14}). Tanto el desgrasado como la extracción, se llevan a cabo en un extractor tipo soxhlet.

Desgrasado de semillas: 250 g de semilla seca, se triturará y se desgrasará con hexano, durante 4 hrs de extracción.

Extracción de limonoides: Para la obtención de extractos, se considera realizará un diseño experimental multifactorial donde los factores sean: el tipo de semilla en tres niveles (limón, naranja, y mandarina), el tiempo de extracción en dos niveles (5 hrs y 8 hrs) y el tipo de solvente en dos niveles (metanol y acetona) como tercer factor, las temperaturas de extracción se mantuvieron constantes a 56°C para acetona y 65°C metanol, obteniendo los extractos por triplicado.

Las variables de respuesta serían el rendimiento de los extractos y la actividad citotóxica.

2.2. Evaluación del efecto citotóxico en linfoblastos L5178Y

Para la evaluación de la citotoxicidad se realizaron cultivos celulares en cajas de 96 pozos (costar 3595) en presencia de diferentes concentraciones de (40µg/µl, 60µg/µl, 80µg/µl y 120µg/µl) sobre células de linfoma L5178Y (5 x 104) el volumen final de cada pozo fue de 200 µL en medio de cultivo RPMI 1640 Gibco pH=7, adicionado de 10 % de suero bovino fetal (Gibco) previamente inactivado, y antibiótico penicilina 5,000 U. I./mL –estreptomicina 5,000 µg/mL (Gibco) 10 mL por cada 500 mL de medio RPMI.

Se utilizó ciclofosfamida (CY-Sigma) (160 mg/mL) como control positivo de citotoxicidad. Las células fueron incubadas por 24 h a 37 oC en atmosfera de CO2 al 5% y humedad relativa del 95 %. Al final del periodo de incubación se evaluó la citotoxicidad por la técnica de MTT.

2.3. Analisis de los extractos

La determinación de limonina mediante HPLC se realizó en un equipo marcaWaters®, equipado con un detector de arreglo de diodos Waters® modelo 996. La separación se llevó a cabo en una columna C 18 de fase reversa PhenomenexLuna de 5 micras 100 Å de 250 x 4.6 mm. Se utilizó una elución isocrática agua/acetonitrilo 54/46%, y con un flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección fue de 30 µL.

La curva de calibración se preparó haciendo una solución madre con una concentración de 0.5 mg de limonina/ml, de la cual se tomó 1ml y se realizaron 5 diluciones consecutivas 1:2, obteniéndose 6 estándares a las siguientes concentraciones: 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625 mg limonina/ml. Todos los estándares y muestras fueron filtradas a través de un filtro milipore de 0.45 µm.Los picos cromatográficos y las áreas fueron analizados mediante el software Empower Pro.

3. Resultados

3.1. Obtención de limonoides

El rendimiento de extracto de limonoides es afectado por el tipo de solvente y por el tipo de fruto, siendo el metanol y las semillas de limón los que permiten obtener un mayor rendimiento de extracto, sin embargo, el tiempo de extracción no resultó trascendental si se pretende maximizar el rendimiento de extracto de limonoides, ya que no existe una diferencia estadística significativa entre las 5 y 8 horas de procesamiento, esto se puede observar en la figura 1.

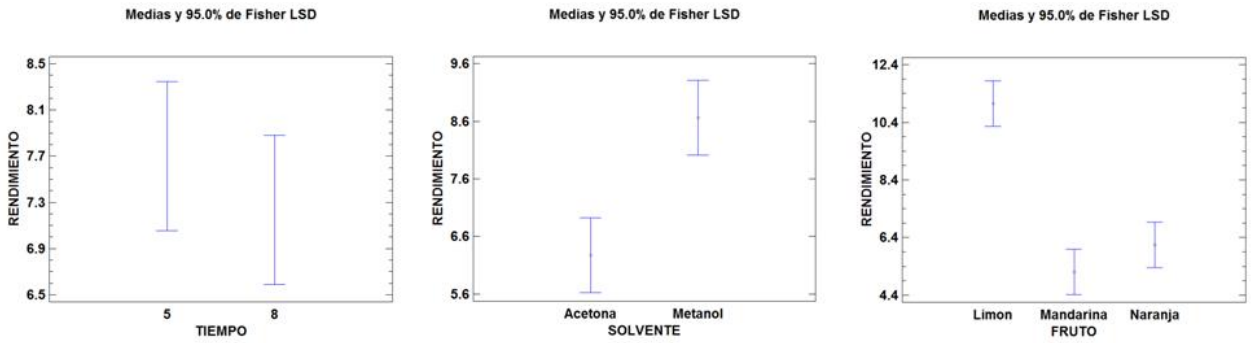


Figura 1. Efecto del tiempo, solvente y fruto sobre el rendimiento.

3.2. Evaluación del efecto citotóxico en linfoblastos L5178Y

Por otra parte, analizando la citotoxicidad que presentan los extractos de semillas, en la figura 2 se observa que la mayor citotoxicidad la presentan los limonoides obtenidos de la semillas de limón, seguida de los obtenidos de la naranja y finalmente los obtenidos de las semillas de mandarina; así como también la alta citotoxicidad de la ciclofosfamida (CY-Sigma) (160 ug/mL), validando su uso como control positivo, y el eficiente control negativo por el crecimiento de las células sin tratamiento durante el proceso.

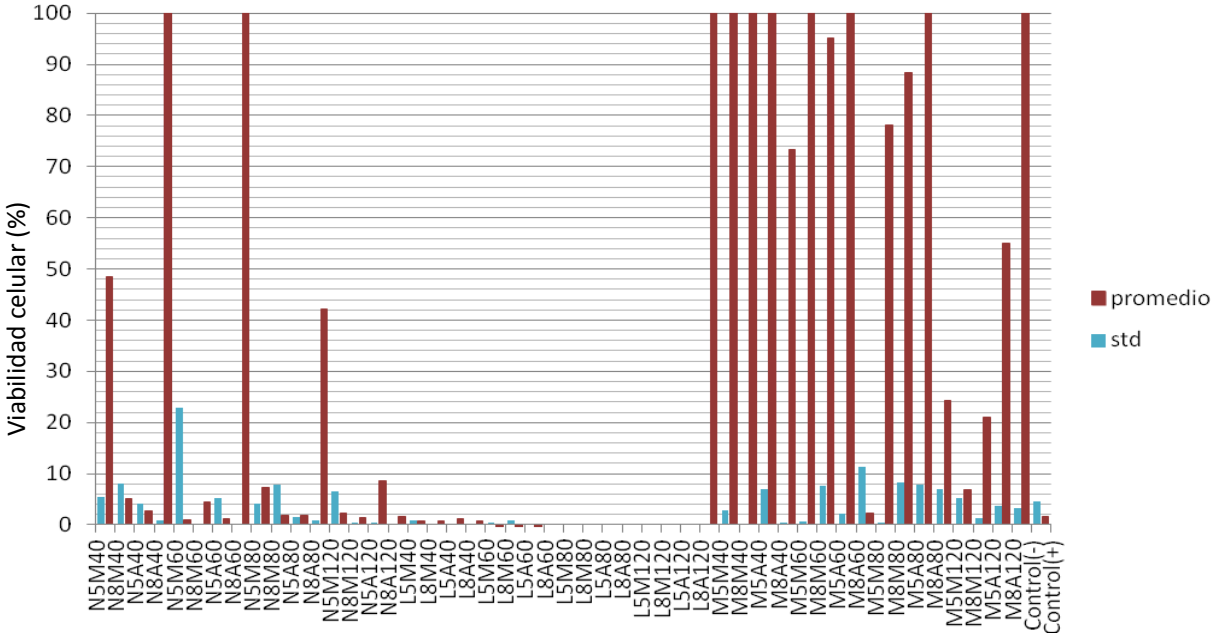


Figura 2. Citotoxicidad de extractos de semillas de cítricos

Donde: N: naranja ,L: limón ,M. mandarina , 5 y 8: Tiempos de proceso, M: metanol y A: acetona , 40-120 dosis ug/ml.

Analizando la citotoxicidad se observa que esta si se ve afectada notablemente por los factores de fruto, concentración, tipo de solvente y tiempo de extracción, ya que al realizar una análisis de varianza presentan valores de P menores a 0.05 y gráficamente se observa en la figura 3.

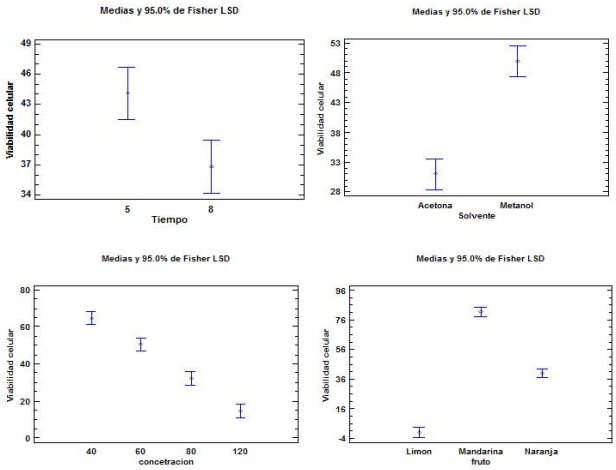
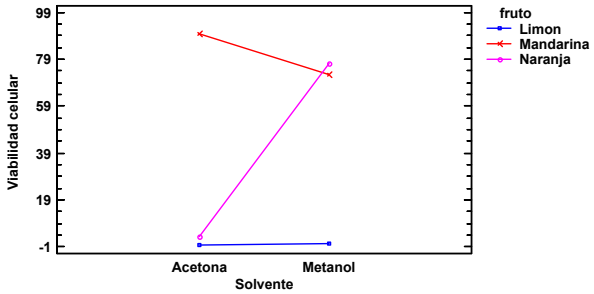


Figura 3. Factores que afectan la citotoxicidad

En la figura 4 se aprecian los factores que afectan a cada semilla cítrica, y se observa que el factor solvente para semilla de limón, no resulta significativo, mientras que para mandarina se logra un mayor citotoxicidad con metanol, y para las semillas de naranja se recomendaría acetona, por otra parte el factor tiempo, no afecta la citotoxicidad de las semillas de limón logrando similitud en la citotoxicidad con tiempo de 5 u 8 h, contrario a como se observa en con las semillas de naranja y mandarina, donde se obtienen mayor citotoxicidad con un tiempo de 8 hrs y 5 h respectivamente.



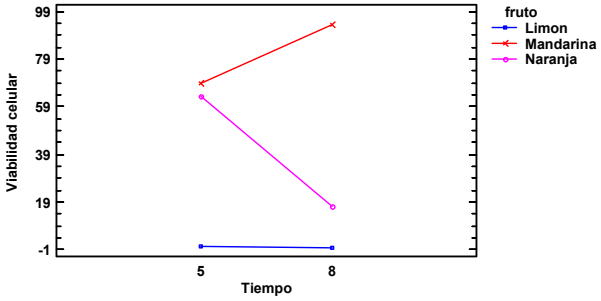


Figura 4. Interacción de los factores solvente-fruto sobre la citotoxicidad

Finalmente se determinaron las dosis citotóxicas medias (CD_{50}) de cada extracto de semillas, encontrándose que para el limón fue menor a concentraciones a 40µg/ml, mientras que los extractos de naranja presentaron una CD_{50} de 50µg/ml y finalmente los de mandarina CD_{50} 95µg/ml, mismas que se pueden observar en la figura 5.

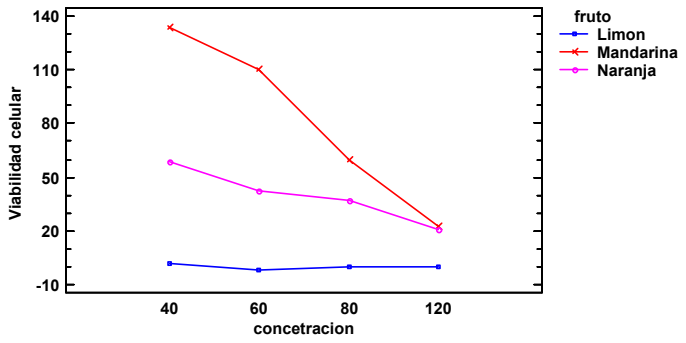


Figura 5. Interacción de los factores concentración-fruto sobre la citotoxicidad

3.3. Analisis de los extractos

Una vez evaluados los diferentes extractos de las semillas de cítricos, se procedió a identificar y cuantificar los extractos del fruto que mayor actividad citotóxica presento, siendo éste el de las semillas de limón.

La identificación cromatográfica se completó con éxito identificando la limonina con un tiempo de retención de 10.524 min. Como se observa en la **Figura 6** perteneciente a un estándar (Sigma-aldrich), el pico de la limonina se aprecia claramente y sin ninguna interferencia después de los 10 min.

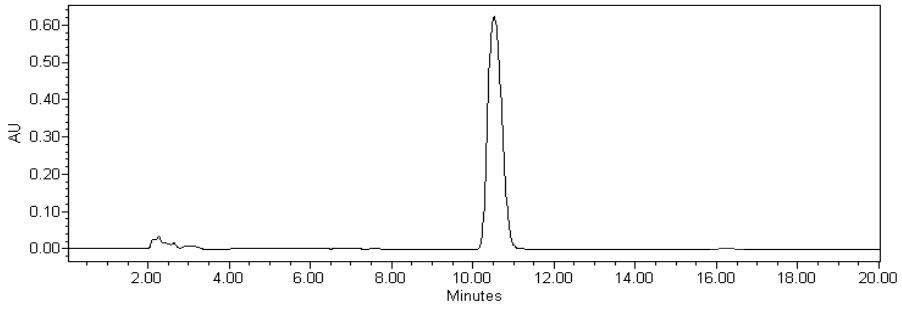


Figura 6. Cromatograma estándar limonina.

En la **Figura 7**, a manera de ejemplo, se presenta el cromatograma de una muestra obtenida con Acetona (7 a) y Metanol (7 b), y al igual que al estándar, se evidencia claramente la presencia de la limonina en el minuto 10 aproximadamente.

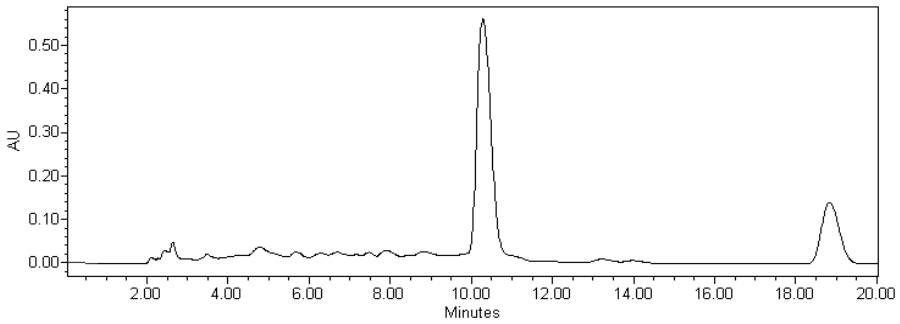


Figura 7 a. Cromatograma muestra de extracto con acetona.

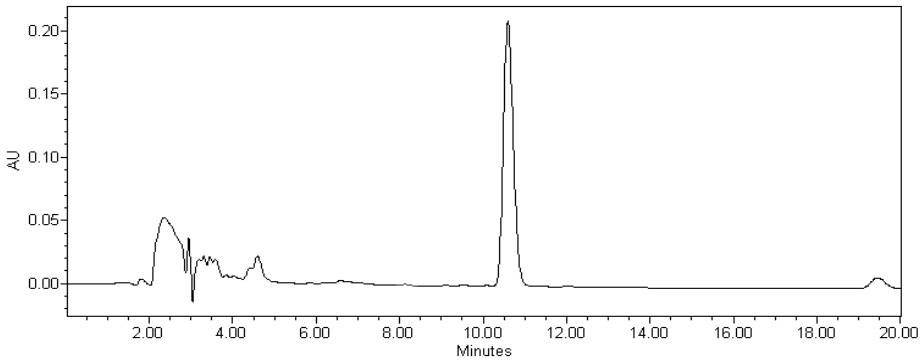


Figura 7 b. Cromatograma muestra de extracto con metanol.

Mediante la inyección de un estándar de limonina fue posible cuantificar su contenido en los extractos de semilla de limón, encontrándose un mayor contenido en el extracto obtenido con metanol que con acetona como se observa en el cuadro 1.

Extracto	**Cantidad de limonina (mg/ gr de semilla limón)**
Metanol	*1.65*
Acetona	*0.779*
Rouseff y Nagy (1982)	*2.02*
Patil (2010)	*1.6 Metanol* *0.48 Acetona*

Cuadro1. Contenido de limonina en extracto de semilla de limón.

4. Discusión

Existe una diferencia importante en el contenido de limonoides según el fruto, contrario a lo que algunos autores [23] reportan, el limón presenta un mayor rendimiento de limonoides, seguido de la naranja y finalmente la mandarina.

Por otra parte, se aprecia que la limonina, limonoide mayoritario en semillas de limón y responsable de la citotoxicidad [24, 25]. no se afecta durante la extracción, contrario a la nomilina, limonide mayoritario en la mandarina, que si ve afectada su citotoxicidad con el tiempo de extracción, finalmente para el caso de las semillas de naranja, se observa que la mayor citotoxicidad se logra en el tiempo de 8 horas, lo que sugiere que esta, al tener un contenido mayor de limonina glicosilada que los demás frutos, el tiempo de extracción afecta el enlace glicosídico, aumentando su citotoxicidad al aumentar la limonina aglicona, quién es la mayor responsable del la actividad citotóxica [24, 25].

Aunque no existen estudios de la actividad citotoxica de semilla de limón mexicano contra células de linfoma L5178Y, existen estudios contra células de cáncer de colon y de páncreas a partir de extractos con solventes, de jugo de limón donde reportan una CD_{50} > 200 µg/ml para 24 h de incubación; en algunos otros estudios realizados con extractos de semillas de limón mexicano, se enfocan en estudiar la proliferación celular de células de cáncer "Pac-28" y evalúan la inhibición de dichas células después de diferentes tiempos de incubación en presencia de distintas concentraciones de extracto, muestran que después de 48 h de incubación proliferan entre un 25-60 % a 100 µg/ml, de concentración, lo que representa una dosis mayor a la CD_{50} (< a 40 µg/ml) determinada en este trabajo, evidenciando el potencial de los extractos de la semillas de limón contra células de linfoma L5178Y. [26]

5. Conclusiones

En la presente investigación se evidenció como el tipo de solvente utilizado afecta la citotoxicidad del los extractos, debido a que la cantidad y composición de los mismos se ve afectada por la polaridad del solvente y por el tiempo de extracción.

La actividad citotóxica de los extractos de Citrus aurantifolia Swingle (limón) no se afecta ni por el solvente, ni por tiempo de extracción, mostrando una CD50 menor de 40µg/ml, sin embargo los extractos de Citrus sinensis (naranja) y Citrus reticulata (mandarina) presentan una diferencia significativa al tipo de solvente y el tiempo de extracción, observándose una mayor actividad citotóxica para Citrus sinensis con una CD50 de 50 µg/ml con 8 horas y acetona, y para Citrus reticulata, el extracto de metanol mostró mayor actividad citotóxica con una CD50 95µg/ml a las 5 horas. Estos

resultados muestran que la citotoxicidad se ve afectada por el tipo de solvente y por el tiempo de extracción para Citrus reticulate y Citrus sinensis, y no así para Citrus aurantifolia swingle.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CIATEJ por el apoyo financiero otorgado para el desarrollo de esta investigación a través del Proyecto de INNOVACÍTRICOS-CONACYT.

Referencias

[1] Fernández-López J; Fernández-Ginés J.M; Aleson Carbonell L; Sendra, E; Sayas-Barbera E; Pérez-Alvarez J. A. (2004). Application of functional citrus by products to meat products. Trends food Sci. Tech. 15, pags 176-185.

[2] Braddock, R. J. (1999) Handbook of citrus by-products and processing technology. Wiley, interscience publication.

[3] Bagge, D. (1998). Limonoids: Pesticide to anticancer applications from secondary metabolites of the Rutaceae and Meliaceae. Colorado state University (http: //www.colostate.edu)

[4] Manthey, J.A.; Grohmann, K. (1996). Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. J. Agric. Food Chem. 44: 811-814.

[5] Manthey, J.A.; Grohmann, K. (2001). Phenols in citrus peel byproducts. Concentrations of hidroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses. J. Agric. Food Chem. 49:3268-3273.

[6] Stange, R.; Midland, S.L., Sims, J.; McCollum, T.G. (2002) Differential effects of citrus peel extracts on growth of Penicillium digitatum, P. italicum, and P. expansum. Physiological and molecular plant pathology. 61:303-311.

[7] Cowan, M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12(4): 564-582.

[8] Bocco, A.; Cuvelier, M.E.; Richard, H.; Berset, C. (1998) "Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts". J. Agric. Food Chem. 46: 2123-2129.

[9] Benavente, O.G.; Castillo, J.; Marin, F.R.; Ortuño, A.; Del Río, J.A. (1997). "Uses and properties of Citrus flavonoids". Review. J. Agric. Food Chem. 45(12): 4505-4515.

[10] Berhow Mark A., Shin Hasegwa, and Gary D. Manners. (2000) Citrus Limonoids – Functional Chemicals in Agriculture and Food,American Chemical Society series.

[11] Jayaprakasha,G. K.;Mandadi K.; Poulose, S. M.; Jadegoud,Y.; Nagana Gowda, G. A.; Patil, B. (2008) "Novel triterpenoid from Citrus aurantium L. possesses chemopreventive properties against human colon cancer cells." Bioorg. Med. Chem., 16 (11), 5939–5951.

[12] Bhimanagouda S. Patil, G. K. Jayaprakasha, K.N. Chidambara Murthy, y Amit Vikram, (2009) "Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities,and Challenges, J. Agric. Food Chem., 57, 8142–8160.

[13] Bayazit, V. y Konar, V. (2010). Biochemical and physiological evaluations of limonoids as potential cancer destroyers.Journal of Animal and Veterinary Advances. 9, 1099-1107.

[14] Ruberto, G.; Renda, A.; Tringali, C.; Napoli, E.M.; Simmonds, M.S. (2002).Citrus Limonoids and Their Semisynthetic Derivatives as Antifeedant Agents AgainstSpodopterafrugiperda Larvae. A Structure - Activity Relationship Study.Journal of Agricultural Food and Chemistry. 50, 6766-74.

[15] Vikram, A.; Jayaprakasha, G. K.; Patil, B. S. (2007), Simultaneous determination of citrus limonoid aglycones and glucosides by high performance liquid chromatography. Anal. Chim. Acta 590 (2), 180–186.

[16] Poulose Shibu M, Guddadarangavvanahally K Jayaprakasha, Richard T Mayer, Basavaraj Girennavar y Bhimanagouda S Patil, (2007) "Purification of citrus limonoids and their differential inhibitory effects on human cytochrome P450 enzymes" J Sci Food Agric87:1699–1709.

[17] Schoch, Thomas K, Gary D. Manners, y Shin Hasegawa (2001) "Analysis of Limonoid Glucosides from Citrus by Electrospray Ionization Liquid Chromatography-Mass Spectrometry" J. Agric. Food Chem., 49, 1102-1108.

[18] Hasegawa Shin y Mark Berhow ; 2000. "Analysis of Limonoids by Thin-Layer Chromatography" ACS Symposium SeriesBook citrus limonoid: chapter 3, pages 31-39.

[19] Tian, Q.; Miller, E. G.; Ahmad, H.; Tang, L.; Patil, B. S. Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. Nutr. Cancer 2001, 40 (2), 180–184.

[20] Manners, G. D. Citrus limonoids: analysis, bioactivity, and biomedical prospects. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 8285–8294.

[21] Miller, E. G.; Taylor, S. E.; Berry, C. W.; Zimmerman, J. A.; Hasegawa, S. Citrus limonoids: increasing importance as anticancer agents. In Citrus Limonoids: Functional Chemicals in Agriculture and Foods; Berhow,M. A., Hasegawa, S., Manners, G. D., Eds.; ACS Symposium Series 758;American Chemical Society: Washington, DC, 2000; pp 132-144.

[22] Battinelli, L.; Mengoni, F.; Lichtner, M.; Mazzanti, G.; Saija, A.; Mastroianni, C. M.; Vullo, V. Effect of limonin and nomilin on HIV-1 replication on infected human mononuclear cells. Planta Med. 2003, 10, 910–913.

[23] Rouseff R.L. y Nagy S. (1982). Distribution of limonoids in citrus seeds. Phytochemistry. 21, 85-90.

[24] Berhow. M., Hasegawa S y Manners G. (2000) ."CitrusLimonoids: Increasing Importance as Anticancer agents." Volumen 758. Ed. American Chemical Society.

[25] Patil B. , Turner N., Miller E. y Brodbelt J. (2006) " Potential Health Benefits of Citrus" Volumen 936. Ed. American Chemical Society.

[26] Patil J., Jayaprakasha G.K., Chidambara K.N., Chetti M. y Patil B.(2010) "Characterization of Citrus aurantifolia bioactive compounds and their inhibition of human pancreatic cancer cells through apoptosis" Microchemical Journal 94 108–117.