

Conference Paper

# Semi-synthetic Derivatives of Limonin A: Synthesis Using Basic Hydrolysis and Reduction with NaBH<sub>4</sub>

## Derivados semi sintéticos de la limonina A: Síntesis vía hidrólisis básica y reducción con NaBH<sub>4</sub>

E. R. Ocaña, M. J. Suárez, G. Gilardoni, and O. G. Malagón\*

Departamento de Química, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador

### ORCID

O. G. Malagón: <http://orcid.org/0000-0001-7946-7858>

IX CONGRESO  
INTERNACIONAL DE  
INVESTIGACIÓN DE LA RED  
ECUATORIANA DE  
UNIVERSIDADES Y  
ESCUELAS POLITÉCNICAS Y  
IX CONGRESO  
INTERNACIONAL DE  
CIENCIA TECNOLOGÍA  
EMPRENDIMIENTO E  
INNOVACIÓN  
SECTEI-ESPOCH 2022

Corresponding Author: O. G.  
Malagón; email:  
omalagon@utpl.edu.ec

Published: 9 November 2023

Production and Hosting by  
Knowledge E

© E. R. Ocaña et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

### Abstract

Limonin A (L-A) was obtained from seeds of *Citrus sinensis* that were dried, grounded, and extracted using Soxhlet equipment. Initially, 100% hexane was used to eliminate fats, and finally, 100% dichloromethane was used in order to concentrate and isolate the compound. L-A recrystallization was performed using acetic acid. The purified fraction was identified as limonin according to spectral nuclear magnetic resonance (NMR) data. Two reactions were performed from L-A: Basic hydrolysis that acted on the A' lactone ring producing a sodium salt of the lactone, and reduction with NaBH<sub>4</sub> to reduce the carbonyl of carbon C-7 and generate the corresponding alcohol limonol. The structural modification of abundant secondary metabolites can become a source of new products with biological activity, useful in the pharmaceutical, cosmetic, and agrochemical industries of natural origin.

**Keywords:** *limonin, semisynthetic derivates, bioactive compounds, non-timber forest products.*

### Resumen

La limonina A (L-A) se obtuvo a partir de semillas de *Citrus sinensis*, que fueron secadas, molidas y extraídas en equipo Soxhlet, utilizando inicialmente hexano al 100% para eliminar grasas y finalmente diclorometano al 100% para concentrar y aislar el compuesto. La recristalización de la L-A se realizó utilizando ácido acético. La fracción purificada se identificó como limonina, acorde a los datos espectrales de RMN (Resonancia Magnética Nuclear). A partir de la Limonina A se realizaron dos reacciones: Hidrólisis básica que actuó sobre el anillo de lactona A' produciendo la sal sódica de lactona y reducción con NaBH<sub>4</sub> para reducir el carbonilo del carbono C-7 y generar el correspondiente alcohol limonol. La modificación estructural de metabolitos secundarios abundantes puede convertirse en una fuente para generar nuevos productos con actividad biológica, útiles en las industrias farmacéutica, cosmética y agroquímica de origen natural.

**Palabras Clave:** *Limonina; derivados semisintéticos, compuestos bioactivos, productos forestales no maderables.*

 OPEN ACCESS



## 1. Introducción

La Comisión Europea señala que el mundo necesitará utilizar de manera óptima los recursos biológicos renovables para producir más alimentos, fibras y productos de base biológica. Los bioresiduos tienen un alto potencial para dar lugar a otros procesos productivos, entre ellos el procesamiento de residuos alimentarios que representan aproximadamente el 30% de toda la producción de alimentos a nivel mundial [1]. Los productos cítricos son ampliamente utilizados en productos alimenticios, dejando residuos valiosos como flavonoides cítricos, aceites fijos, aceites esenciales y limonoides [1]. La evaluación de la actividad biológica de los limonoides ha confirmado su potencial como agentes antibacterianos [2], antifúngicos [2], antivirales [3], citotóxicos [4, 5] e insecticidas [3], así como productos antinociceptivos [6] y antiinflamatorios [7,8]. Los limonoides son metabolitos secundarios que se encuentran en grandes cantidades en los cítricos y están siendo investigados debido a su amplia y probada variedad de efectos terapéuticos [9].

Entre los limonoides que se encuentran en diferentes especies de cítricos como *C. limon*, *C. sphaerocarpa*, *C. sinensis*, *C. trifoliata* y *C. reticulata*, la limonina puede considerarse el limonoide más importante [7, 10, 11], se obtiene un promedio de 70% de limonina de un aceite fijo de cítricos como componente principal [12]. La limonina (L-A) es una sustancia blanquecina, amarga, cristalina, cuya presencia está relacionada con el amargor de los jugos [3] y cuya forma agliconada se encuentra frecuentemente en alta concentración en las semillas. Desde que la limonina se identificó por primera vez como analgésico y antiinflamatorio [8], se han realizado múltiples esfuerzos para estudiar su aplicación clínica; sin embargo, la rigidez de su estructura y su baja solubilidad en agua ( $<0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) motivaron el desarrollo de investigaciones farmacológicas sobre derivados de L-A [2, 20].

Los derivados de limonina se pueden preparar mediante modificaciones estructurales en los anillos A, B o D. Los estudios muestran que el puente de oxígeno (epóxido) entre las posiciones C-14 y C-15 juega un papel importante en las estructuras de analgésicos y antiinflamatorios [13,14]. La reducción en la posición C-7 ha generado compuestos alcohólicos y a partir de ellos se han preparado sus acetatos, oximas y metoximas [2]. La hidrogenación del anillo de furano y modificaciones en el anillo A también se han llevado a cabo mediante reacciones de aminólisis con aminas primarias, generando un número considerable de derivados sintéticos que presentan mayor actividad antialimentaria que la limonina inicial [2]. Un isómero obtenido a partir de la limonina llamado ácido limonéxico se obtuvo por exposición del anillo furano a un ácido fuerte [12]. Se ha informado de la introducción de varios residuos de amina terciaria



en la posición C-7 de limonina o desoxilimonina, así como de un compuesto llamado lactona de anillo A del ácido limonoico, una de las dos posibles monolactonas que pueden derivarse de la limonina por hidrólisis parcial [3]. Se han sintetizado series de derivados de amida de anillo A de limonina que mostraron una actividad antimicrobiana optimizada contra una colección de microorganismos [13]. Además, la limonina se ha convertido en alcaloides mediante la adición de fenetilamina o bencilamina sustituida en el anillo A, a través del intercambio de amida, con el propósito de superar el problema de la solubilidad en agua que puede potenciar su actividad biológica [15].

En el presente artículo reportamos el proceso hemisintético de obtención de dos derivados de L-A, considerando la utilidad de la modificación estructural de la limonina A para el diseño de moléculas con propiedades químicas que potencien su actividad biológica.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Información general

Los espectros  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HMBC, HSQC para la caracterización de limonoides en el presente estudio fueron adquiridos a 500 MHz y 125 MHz, en un equipo Bruker Ascend Magnet System 500'54, serie: MSC 10201, consola modelo AvanceNeo, utilizando tetrametilsilano como referencia interna. Se usaron cloroformo deuterado y metanol deuterado como solventes, los desplazamientos químicos se expresaron en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se informaron en (Hz).

Los espectros de masas de los limonoides sintetizados se obtuvieron mediante HPLC-ESI-MS (cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas). Los compuestos resultaron ser solubles en acetonitrilo de grado HPLC y se inyectaron en un equipo Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 – Autosampler acoplado a un detector de masas (Brüker amaZOn-ESI) a una concentración de 30  $\mu\text{g/mL}$  con una longitud de onda de barrido de 200 a 600 nm. La corrida cromatográfica se realizó en una columna empaquetada  $\text{C}_{18}$  (longitud 150 mm x 4,6 mm y porosidad 5  $\mu\text{m}$ ) [14]. El horno de la columna se ajustó a 30 °C y el volumen de inyección de la muestra fue de 5  $\mu\text{L}$ . Se utilizó un gradiente que consistía en agua y ácido fórmico al 0,1 % (disolvente A) y metanol (disolvente B) a un caudal de 0,2 mL/min. El programa de elución se aplicó de la siguiente manera: 0 min, 30% B; 10 min, 100% B; 30 min, 30% B.



## 2.2. Tratamiento del material vegetal y obtención de Limonina -A

La limonina L-A se extrajo de semillas de *Citrus sinensis* secadas a 45 °C por 24 horas, posteriormente se molieron y extrajeron en equipo Soxhlet, utilizando 700 mL de hexano al 100% para eliminar los aceites fijos y luego 700 mL de 100 % de diclorometano para el aislamiento de compuesto (limonina bruta). Cada extracción se llevó a cabo en 8 horas. Finalmente, se purificó por recristalización con ácido acético, obteniendo 5g de limonina A pura, que se identificó por comparación de espectros de RMN [16, 20].

## 2.3. Hemisíntesis de derivados

### 2.3.1. Sal sódica de anillo A lactona de ácido limonoico (Figura 1).

Se disolvieron 50 mg de L-A en 25 mL de NaOH acuoso (4,4 M), y se dejó reaccionar durante 12 h en agitación constante a 40 °C. Para finalizar la reacción, la mezcla se trató con 25 mL de HCl 2,0 M hasta pH 3, la extracción de la mezcla de reacción se realizó en un embudo de decantación utilizando 50 mL de DCM ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), el proceso se repitió tres veces hasta separar la fase orgánica de la acuosa. La fase orgánica se secó sobre 1,0 g de sulfato de sodio anhidro y el disolvente residual se evaporó a presión reducida en un evaporador rotatorio.

La purificación se realizó en una columna con 3,0 g de sílice  $\text{SG}_{60}$  impregnada con el producto, pudiendo separarse eficazmente el derivado en condiciones isocráticas con MeOH puro.

### 2.3.2. Limonol

Se trataron 50 mg de L-A con 4,16 mg de  $\text{NaBH}_4$  disueltos en 5mL de MeOH anhidro que se añadió gota a gota a la limonina previamente diluida en 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La mezcla se agitó continuamente a 3°C (baño de hielo) durante 4 h. La reacción se detuvo mediante la adición de 10 mL de HCl diluido 0,1 M. Posteriormente, se añadieron a la mezcla de reacción 50 mL de DCM por tres veces para separar la fase orgánica de la acuosa por decantación. La fase orgánica se secó sobre 1,0 g de sulfato de sodio anhidro y el disolvente residual se evaporó a presión reducida en un evaporador rotatorio.

La purificación del derivado se realizó en el equipo de cromatografía flash Reveleris® PREP, en una columna de sílice genérica de 220 g con un flujo de 150 mL/min con el



detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD) y detector de absorción de luz UV, utilizando como fase móvil la mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (98:2) en condiciones isocráticas.

Al final de las reacciones, los productos fueron identificados por TLC, los limonoides se evidenciaron por las marcas características de color naranja observados bajo luz UV (254nm) en la placa revelada con el reactivo de Eldrich y expuesta a los gases HCl.

### 3. Resultados

Los factores de retención TLC- correspondientes presentados para los limonoides son: L-A (0.38), Derivado 1- Sal sódica (0.14) y Derivado 2 - Limonol (0.20), valores promedio en cada reacción para TLC con polaridad  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - MeOH 97: 3.

Para el aislamiento de limonina cristalizada (molécula original L-A) a partir de semillas de *Citrus sinensis* se obtuvo un rendimiento de 33,0% en comparación con el extracto puro. El rendimiento de la reacción de hidrólisis básica fue del 10,0 % y el de la reacción de reducción del 64,2 %.

#### 3.1. Caracterización del compuesto aislado

##### 3.1.1. Sal sódica de lactona de anillo A del ácido limonoico (Figura 1)

( $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_9\text{Na}$ ). El producto de la hidrólisis básica se sintetizó por la apertura del anillo de lactona A. Sólido amorfo blanco. La masa molecular se determinó por ESI-MS: m/z 511,20  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . Rendimiento de 5,0 mg a partir de 50,0 mg de L-A. El cromatograma de referencia de HPLC se presenta en la Figura 2.

En la (Tabla I) se detallan los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de la sal sódica, aparecen dos carbonilos a 171,9 ppm y 168,4 ppm (desplazamientos de éster) advirtiendo que no se ejecutó la hidrólisis total, pero para el C-19, sitio de apertura de la lactona A, los desplazamientos cambian de 65,4 ppm (molécula de partida L-A) a 65,0 ppm (derivado). Aparecen nuevas señales de desplazamiento de  $^1\text{H}$  entre 4,0 y 4,5 ppm que probablemente corresponderían al protón próximo al C-19.

Nota. d: doblete; dd: doble doblete; m: multiplete; t: triplete; s: singlete,  $s_a^*$ : singlete ancho,  $m^*$ : multiplete, (ciertas señales pueden estar ocultas debido a la mezcla de productos).

La aplicación de condiciones básicas de hidrólisis a la L-A no generó el producto de hidrólisis esperado, pero se logró la apertura del anillo de lactona A para producir la sal descrita.

**Tabla 1**

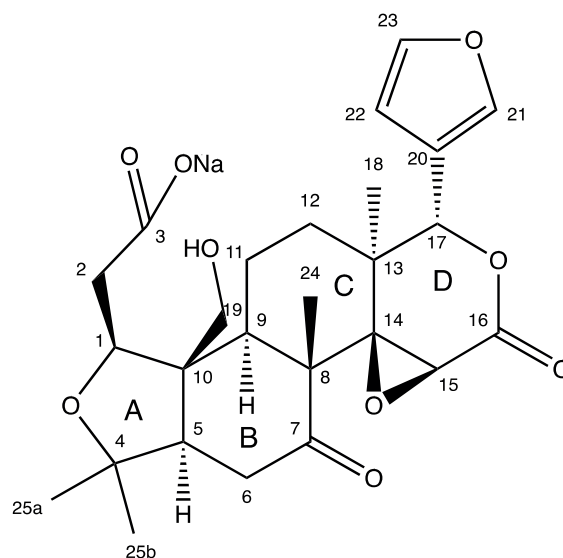
Espectro RMN de sal sódica de lactona de anillo A del ácido limonoico:  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

$^{13}\text{C}$	$\delta$	$^1\text{H}$			
$\text{C}_1$	79.04	4.00 (m, 1H)			
$\text{C}_2$	35.32	$\text{H}_{2a}$	2.48 (dd, 1H, J 9.5, 15 Hz, H-2a)	$\text{H}_{2b}$	3.06 (dd, 1H, J 14, 30 Hz, H-2b)
$\text{C}_3$	<b>171.94</b>	-			
$\text{C}_4$	80.14	-			
$\text{C}_5$	59.64	1.89 (m, 1H)			
$\text{C}_6$	36.19	$\text{H}_{6a}$	2.01 (m, 1H, H-12a)	$\text{H}_{6b}$	2.79 (dd, 1H, J 3, 15 Hz, H-6b)
$\text{C}_7$	209.36	-			
$\text{C}_8$	52.64	-			
$\text{C}_9$	48.10	2.23 ( $m^*$ , 1H)			
$\text{C}_{10}$	45.89	-			
$\text{C}_{11}$	20.28	$\text{H}_{11a}$	1.75 (m, 1H, H-11a)	$\text{H}_{11b}$	1.76 (m, 1H, H-11b)
$\text{C}_{12}$	30.56	$\text{H}_{12a}$	1.29 (m, 1H, H-12a)	$\text{H}_{12b}$	1.89 (m, 1H, H-12b)
$\text{C}_{13}$	37.84	-			
$\text{C}_{14}$	65.51	-			
$\text{C}_{15}$	53.63	3.76 (s, 1H)			
$\text{C}_{16}$	<b>168.37</b>	-			
$\text{C}_{17}$	78.60	5.49 ( $s_a^*$ , 1H)			
$\text{C}_{18}$	20.43	1.13 (s, 3H)			
$\text{C}_{19}$	<b>64.99</b>	$\text{H}_{19a}$	4.62 (d, 1H, J 4 Hz H-19a)	$\text{H}_{19b}$	4.60 (d, 1H, J 3.5 Hz H-19b)
$\text{C}_{20}$	120.45	-			
$\text{C}_{21}$	142.96	7.48 ( $m^*$ , 1H)			
$\text{C}_{22}$	109.62	6.44 ( $s_a^*$ , 1H)			
$\text{C}_{23}$	141.23	7.52 ( $m^*$ , 1H)			
$\text{C}_{24}$	20.18	1.04 (s, 3H)			
$\text{C}_{25}$	30.29 22.71	$\text{H}_{25a}$	1.18 (s, 4H, H-25a)	$\text{H}_{25b}$	1.15 (t, 3H, H-25b)

### 3.2. Limonol (Figura 3)

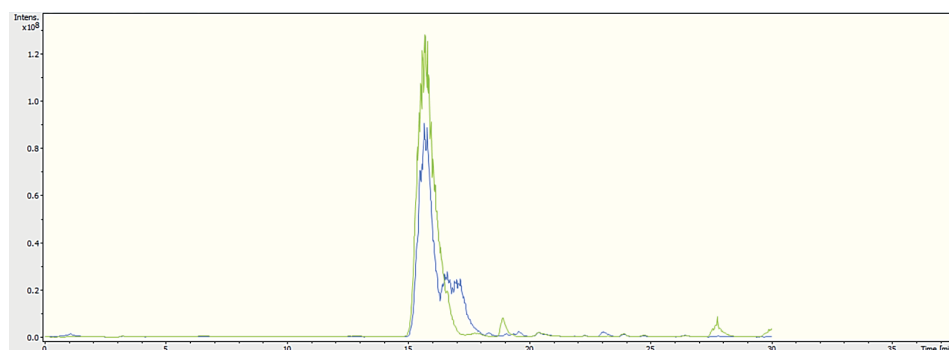
( $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_8$ ) El producto de reducción con  $\text{NaBH}_4$  se sintetizó por reducción de carbono C-7. Sólido amorfo blanco, soluble en cloroformo. La masa molecular se determinó por ESI-MS:  $m/z$  472,84;  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $[\alpha]_{25\text{D}} = + 62,00$  (c 0,25,  $\text{Me}_2\text{CO}$ ). El cromatograma de referencia de HPLC se presenta en la Figura 4.

En la (Tabla II) se detallan las señales identificadas en los espectros de RMN del producto de la reducción de C-7 de ácido carboxílico a alcohol en el limonol, se reportan desplazamientos de  $^{13}\text{C}$  que en la molécula inicial se encuentran a 206,2 ppm (desplazamiento de ácido carboxílico) a 77,5 ppm para el derivado (desplazamiento de



**Figura 1**

*Sal sódica de lactona de anillo A de ácido limónico.*



**Figura 2**

*Cromatograma comparativo de la molécula de partida (señal verde) y derivado (señal azul).*

alcohol). Además, se observa una nueva señal  $^1\text{H}$  para la posición C-7 del hidrógeno correspondiente al hidrógeno del alcohol a 3.86 ppm.

## 4. Discusión

La Figura 5 representa el posible mecanismo de apertura de la lactona de anillo A (a) y la reducción del carbonilo C-7 (b), respectivamente.

Se han reportado reacciones de síntesis previas de limonol a temperaturas más bajas ( $-5\text{ }^\circ\text{C}$ ) utilizando una mayor cantidad de agente reductor (110 mg) y un tiempo de reacción más prolongado (24 h) [2].

**Tabla 2**

Espectro RMN de limonol:  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

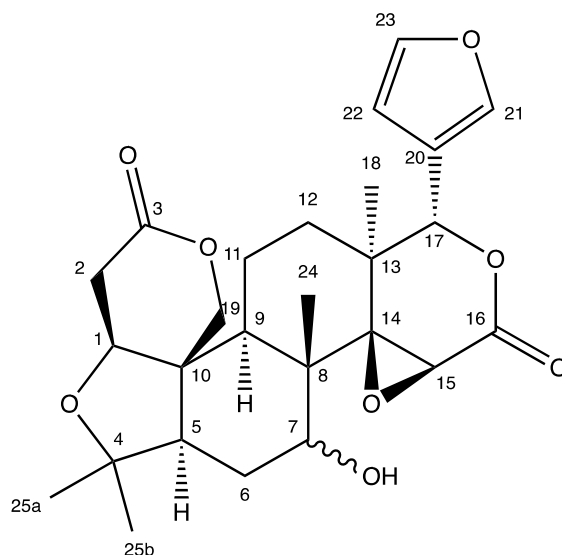
$^{13}\text{C}$	$\delta$	$^1\text{H}$			
$\text{C}_1$	79.50	3.97 (d, 1H, J 3Hz )			
$\text{C}_2$	35.55	$\text{H}_{2a}$	2.5 (dd, 1H, J 17, 1.75 Hz, H-2a)	$\text{H}_{2b}$	2.91 (dd, 1H, J 16.5, 4 Hz, H-2b)
$\text{C}_3$	169.53	-			
$\text{C}_4$	80.63	-			
$\text{C}_5$	58.40	1.87 (dd*, 1H, J 15.8, 3.25 Hz)			
$\text{C}_6$	30.67	1.57 (s, 8H)			
$\text{C}_7$	<b>77.75</b>	<b>3.86 (t<sub>a</sub>, 1H, J 3.50 Hz )</b>			
$\text{C}_8$	45.56	-			
$\text{C}_9$	45.75	2.29 (dd*, 1H, J 12.25, 6.75 Hz)			
$\text{C}_{10}$	43.69	-			
$\text{C}_{11}$	25.68	$\text{H}_{11a}$	1.72 (m, 1H, H-11a)	$\text{H}_{11b}$	1.51 (m, 1H, H-11b)
$\text{C}_{12}$	18.98	$\text{H}_{12a}$	1.25 (m, 1H, H-12a)	$\text{H}_{12b}$	1.23 (m, 1H, H-12b)
$\text{C}_{13}$	39.32	-			
$\text{C}_{14}$	72.95	-			
$\text{C}_{15}$	56.41	4.54 (s, 1H)			
$\text{C}_{16}$	167.81	-			
$\text{C}_{17}$	77.90	5.62 (s, 1H)			
$\text{C}_{18}$	18.30	1.24 (s, 3H)			
$\text{C}_{19}$	65.69	4.48 (d, 2H, J 8Hz )			
$\text{C}_{20}$	120.20	-			
$\text{C}_{21}$	141.29	7.42 (s <sub>a</sub> , 1H)			
$\text{C}_{22}$	109.78	6.31 (dd*, 1H, J 0.5, 1.5 Hz)			
$\text{C}_{23}$	143.19	7.41 (d*, 1H)			
$\text{C}_{24}$	13.68	1.02 (s, 3H)			
$\text{C}_{25}$	21.56 28.56	$\text{H}_{25a}$	1.14 (s, 4H, H-25a)	$\text{H}_{25b}$	1.28 (t, 5H, H-25b)

Nota. d: doblete; dd: doble doblete; m: multiplete; t: triplete; s: singlete, s<sub>a</sub>\*: singlete ancho, m\*: multiplete, d\*: doblete (ciertas señales pueden estar ocultas debido a la mezcla de productos.)

Se ha demostrado que el limonol tiene actividad biológica. De hecho, Liu y colaboradores [17] ya han demostrado que los derivados de limonina con funciones más polares en C-7 podrían disminuir el consumo y las tasas de crecimiento de plagas como *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de Colorado) más que la limonina.

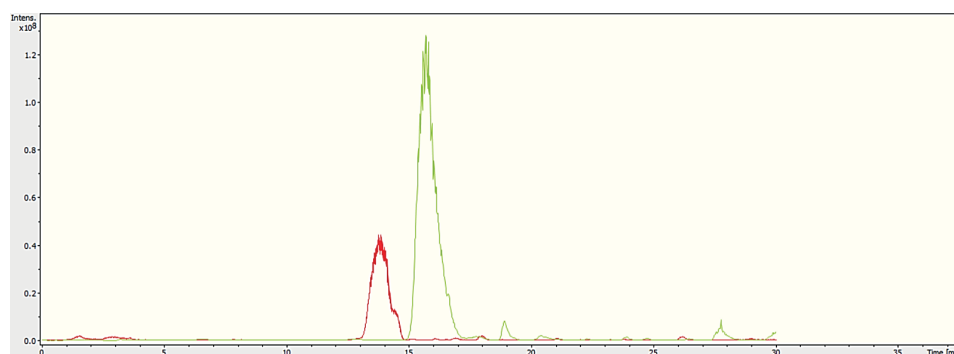
La reducción del C-7 de la limonina también se ha realizado con  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  en condiciones de temperatura ambiente, empleando cantidades de agente reductor (50 mg) mayores que las descritas en este artículo. El limonol mostró efectos moderados de inhibición, lo que indica que la apertura de los anillos puede ser útil para la evaluación





**Figura 3**

*Limonol.*



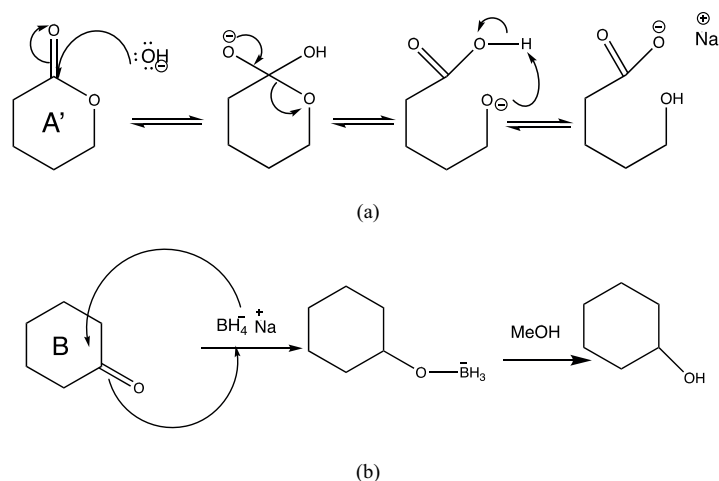
**Figura 4**

*Cromatograma comparativo de la molécula de partida (señal verde) y derivado (señal roja).*

de la actividad antiinflamatoria y mostró la inhibición del TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral) [18].

Sobre la actividad biológica de los derivados posteriores obtenidos del limonol: oxima (limonina-7-oxima), metoxima (limonina-7-metoxima) y sus acetatos (limonina-7-oxima acetato, limonil acetato). La limonina-7-metoxima fue el compuesto semisintético más activo como agente antialimentario contra las larvas de *Spodoptera frugiperda* [2]. Los datos anteriores confirman la importancia de seguir investigando en este campo.

Se ha informado de un dihidroxiácido derivado de la limonina por hidrólisis completa de las lactonas (ácido limonoico), teniendo en cuenta que los anillos A y D en la molécula inicial son  $\delta$ -lactonas que se pueden abrir de forma reversible, el ácido puede dar lugar a dos formas de monolactonas: lactona de anillo A de ácido limonoico

**Figura 5**

Mecanismos propuestos para (a) apertura en medio básico del anillo lactona y (b) reducción de C-7 -  $\text{NaBH}_4$ .

y lactona de anillo D de ácido limonoico [19]. El significado biosintético de los derivados mencionados anteriormente está bajo revisión y no se han encontrado estudios de la actividad biológica de estos compuestos. Por lo tanto, el análisis de la actividad biológica de la sal (sal sódica de lactona del anillo A del ácido limonoico) debería llevarse a cabo en el futuro.

## 5. Conclusiones

Se obtuvieron dos derivados identificados como sal sódica de lactona del anillo A del ácido limonoico y limonol. El limonol ya se ha descrito en la literatura, pero la sal sódica del ácido monocarboxílico puede considerarse un nuevo compuesto. Este derivado presenta mayor polaridad que la molécula L-A inicial, la cual fue identificada con pruebas de solubilidad y por métodos de TLC, por lo que podría ser referido como favorable para el estudio de la actividad biológica y la posterior aplicación farmacológica.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Técnica Particular de Loja por el apoyo financiero y al programa PROAmazonía (Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica y Ministerio de Agricultura y Ganadería de Ecuador) por el apoyo a la publicación.



## Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

## References

- [1] Galdani R, Cavalluzzi MM, Lentini G, Habtemariam S. The chemistry and pharmacology of citrus limonoids. *Molecules*. 2016;21:1–39 p. <https://doi.org/10.3390/molecules21111530>.
- [2] Ruberto G, Renda A, Tringali C, Napoli EM, Simmonds MS. Citrus limonoids and their semisynthetic derivatives as antifeedant agents against *Spodoptera frugiperda* larvae. A structure-activity relationship study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002 Nov;50(23):6766–6774.
- [3] Wang SC, Yang Y, Liu J, Jiang AD, Chu ZX, Chen SY, et al. Discovery of novel limonin derivatives as potent anti-inflammatory and analgesic agents [Internet]. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2018 Mar;16(3):231–240.
- [4] Jacob R, Hasegawa S, Manners G. The potential of citrus limonoids as anticancer agents. *Perishables Handl Q* [Internet]. 2000;( May 2000):6–8. Available from: <http://ucanr.edu/datastoreFiles/234-200.pdf>
- [5] Ejaz S, Ejaz A, Matsuda K, Chae WL. Limonoids as cancer chemopreventive agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006;86(3):339–345.
- [6] Yang Y, Wang X, Zhu Q, Gong G, Luo D, Jiang A, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of novel limonin derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents with high water solubility. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2014 Apr;24(7):1851–1855.
- [7] Rouseff RL, Fisher JF. Determination of limonin and related limonoids in citrus juice by high performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*. 1980;52(8):1228–1233.
- [8] Huang S, Liu X, Xiong B, Qiu X, Sun G, Wang X, et al. Variation in limonin and nomilin content in citrus fruits of eight varieties determined by modified HPLC [Internet]. *Food Science and Biotechnology*. 2018 Nov;28(3):641–647.
- [9] Arnott GE. Reduction of carboxylic acids and their derivatives to alcohols, ethers, and amines. *Comprehensive Organic Synthesis - 2nd Edition*. 2014;8:368–409.
- [10] Zhang Y, Xu H. Recent progress in the chemistry and biology of limonoids [Internet]. *RSC Advances*. 2017;7(56):35191–35220.



- [11] Castillo Herrera GA. Evaluación de la actividad citotóxica de limonoides de semillas de cítricos extraídos con CO<sub>2</sub> supercrítico. 2015;127. Available from: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/94/1/GustavoAdolfoCastilloHerrera.pdf>
- [12] Kim J, Jayaprakasha GK, Uckoo RM, Patil BS. Evaluation of chemopreventive and cytotoxic effect of lemon seed extracts on human breast cancer (MCF-7) cells [Internet]. *Food and Chemical Toxicology*. 2012 Feb;50(2):423–430.
- [13] Tavares LC, Fernandes TS, Ilha V, Neto AT, Dos Santos EW, Burrow RA, et al. Limonin derivatives: synthesis using methodology in solution and heterogeneous medium and evaluation of the antimicrobial activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2016;27(1):161–178.
- [14] Breksa AP 3rd, Dragull K, Wong RY. Isolation and identification of the first C-17 limonin epimer, epilimonin. *J Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008 Jul;56(14):5595–5598.
- [15] Wang S, Han X, Yang Y, Zhou C, Luo D, He W, et al. Discovery of deoxylimonin  $\delta$ -lactam derivative with favorable anti-inflammation and antinociception efficacy from chemical modified limonin/deoxylimonin analogs [Internet]. *Bioorganic Chemistry*. 2020 Jul;100(April):103886.
- [16] Tian Q, Schwartz SJ. Mass spectrometry and tandem mass spectrometry of citrus limonoids. *Analytical Chemistry*. 2003 Oct;75(20):5451–5460.
- [17] Liu YB, Alford AR, Rajab MS, Bentley MD. Effects and modes of action of citrus limonoids against *Leptinotarsa decemlineata*. *Physiological Entomology*. 1990;15(1):37–45.
- [18] Hu YH, Liu J, Li H, Tang W, Li XW, Guo YW. Chemical constituents from citrus changshan-huyou and their anti-inflammatory activities. *Chemistry & Biodiversity*. 2020 Nov;17(11):e2000503.
- [19] Maier VP, Margileth DA. Limonoic acid A-ring lactone, a new limonin derivative in Citrus. *Phytochemistry*. 1969;8(1):243–248.
- [20] Ozaki Y, Ayano S, Inaba N, Miyake M, Berhow MA, Hasegawa S. Limonoid Glucosides in Fruit, Juice and Processing by-products of Satsuma Mandarin (*Chrus unshiu* Marcov.). *Journal of Food Science*. 1995;60(1):186–189.