

COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTI-*Candida albicans* DE ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”

Norma Ramos Cevallos^{*a}, Américo Castro Luna^a, Felix Castillo Morales^a, Lourdes Victoria Tinoco^a, Sixto Gonzáles Elera^a, Mario Alcarraz Curi^b, Arcadio Zuñiga Santi^a, Nicole Arquínigo Bazan^a, Diana Victorio Cruz^a, Diana Chavez Rojas^a, Yahaira Tapia Burga^a

RESUMEN

Introducción. - El "nogal peruano" es un árbol grande distribuido en varias regiones del Perú, principalmente en áreas de bosques secundarios tardíos y maduros. Las especies proveedoras de aceites esenciales antioxidantes son consideradas valiosas para aplicaciones en el área de la salud. Los aceites esenciales con diversos constituyentes muestran efectos sinérgicos y pueden ser una alternativa eficaz para prevenir enfermedades.

Objetivos. - Evaluar la composición química, actividad antioxidante y anti-*Candida albicans* del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels.

Materiales y métodos. - Se obtuvo el aceite esencial mediante una destilación por arrastre de vapor de agua. Se analizó su composición química por un análisis GC-MS y se evaluó su actividad antioxidante según los métodos de DPPH• y ABTS•+. Además, se determinó su actividad anti-*Candida albicans*, adaptando protocolos, utilizando ketoconazol como referencia. Se diluyó el aceite en DMSO y se incubó con *Candida albicans*, midiendo el crecimiento mediante lecturas a las 24 horas en microplacas de 96 pocillos.

Resultados. - El análisis de la composición química por GS-MS reveló la presencia de compuestos como el fitol, α -pineno, α -caryophyllene, copaeno y D-limoneno. Según el método DPPH•, el aceite esencial mostró un IC₅₀ de 52,25 ul/ml. Con el método ABTS•+ el IC₅₀ fue de 34,65 ul/ml. Sin embargo, no se observó actividad anti-*Candida albicans*.

Conclusiones. - Los compuestos químicos de mayor importancia del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels fueron el α -pineno, D-limoneno y Copaeno. Además, presentó una actividad antioxidante regular y una nula actividad anti-*Candida albicans*.

Palabras clave: antioxidantes, *Candida albicans*, aceites volátiles, *Juglans*, antifúngicos, fitoquímicos.

^a Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Jr. Puno N.º 1002, Lima, Perú.

^b Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Av. Germán Amézaga N.º 375 N.º 15081, Lima, Perú. *Autor de correspondencia: nramosc@unmsm.edu.pe

CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTI-*Candida albicans* ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM THE LEAVES OF *Juglans neotropica* Diels “peruvian walnut”.

ABSTRACT

Introduction. - The "nogal peruano" is a large tree distributed in several regions of Peru, mainly in areas of late secondary and mature forests. Species supplying antioxidant essential oils are considered valuable for health applications. Essential oils with various constituents show synergistic effects and can be an effective alternative to prevent diseases.

Objectives. - To evaluate the chemical composition, antioxidant and anti-*Candida albicans* activity of the essential oil of *Juglans neotropica* Diels leaves.

Materials and methods. - The essential oil was obtained by steam distillation. Its chemical composition was analyzed by GC-MS analysis and its antioxidant activity was evaluated according to DPPH• and ABTS•+ methods. In addition, its anti-*Candida albicans* activity was determined, adapting protocols, using ketoconazole as a reference. The oil was diluted in DMSO and incubated with *Candida albicans*, measuring growth by 24-hour readings in 96-well microplates.

Results. - Chemical composition analysis by GS-MS revealed the presence of compounds such as phytol, α -pinene, α -caryophyllene, copaene and D-limonene. According to the DPPH• method, the essential oil showed an IC₅₀ of 52.25 μ l/ml. With the ABTS•+ method the IC₅₀ was 34.65 μ l/ml. However, no anti-*Candida albicans* activity was observed.

Conclusion. - The most important chemical compounds of the essential oil of *Juglans neotropica* Diels leaves were α -pinene, D-limonene and Copaene. In addition, it presented regular antioxidant activity and null anti-*Candida albicans* activity.

Key words: antioxidants, *Candida albicans*, oils volatile, *Juglans*, antifungal agents, phytochemicals.

INTRODUCCIÓN

El "nogal peruano" (*Juglans neotropica* Diels) es un árbol de gran tamaño, con un tronco recto y cilíndrico, que puede alcanzar hasta 35 metros de altura y tener un diámetro de entre 30 y 120 centímetros. En el Perú, se encuentra distribuido en varias regiones, incluyendo Amazonas, Cajamarca, Cusco, Huancavelica, Junín, La Libertad, Lambayeque, Cerro de Pasco y desde altitudes de 500 hasta 3300 metros sobre el nivel del mar, principalmente en áreas de bosques secundarios tardíos y maduros ^(1,2).

Las especies proveedoras de aceites esenciales con actividad antioxidante se consideran como fuentes potenciales para el descubrimiento y desarrollo de compuestos activos con aplicaciones médicas, farmacéuticas y cosméticas. Tienen una gran ventaja sobre los antioxidantes sintéticos que se sospecha sean nocivos para la salud ⁽³⁾. Actualmente existe un gran interés en el diseño y desarrollo de formulaciones innovadoras que incluyen estos aceites esenciales.

Los aceites esenciales pueden contener más de 50 constituyentes en su composición química y sus evaluaciones in vitro e in vivo están asociadas a los efectos sinérgicos resultantes ⁽⁴⁾. Se ha demostrado que los aceites esenciales ricos en fenoles como el eugenol y timol exhiben un buen potencial antioxidante en los sistemas biológicos, a comparación de los no fenólicos ⁽⁵⁾. Por esta razón, los aceites esenciales pueden ser alternativa eficaz para prevenir la auto oxidación, mantener el equilibrio endógeno entre los antioxidantes y la generación de radicales libres, y así revertir y mejorar las enfermedades degenerativas ⁽⁶⁾.

El contenido de compuestos bioactivos en las plantas es dependiente del ambiente y manera en la que se desarrolló; estos factores afectan en gran medida sus compuestos químicos y por ende sus propiedades medicinales ⁽⁷⁾. El objetivo del presente trabajo es evaluar la composición química, actividad antioxidante y anti-*Candida albicans* del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels.

PARTE EXPERIMENTAL

Colecta y tratamiento de las muestras

Las hojas de *Juglans neotropica* Diels fueron adquiridas en el distrito de Chachapoyas, departamento de Amazonas, Perú. El proceso de recolección tuvo lugar a principios del año 2023. Posteriormente, las hojas se dejaron al aire libre, expuestas directamente a la luz solar, con el fin de llevar a cabo su secado.

Obtención del aceite esencial

El aceite esencial de las hojas de *Juglans neotropica* Diels se obtuvo utilizando un destilador semi industrial de acero inoxidable que funcionaba con vapor de agua. Cada destilación se llevó a cabo con una cantidad de 6 Kg de material, y en total se procesaron 13 kg de materia vegetal seca. El rendimiento final fue de 0,03 % v/p de aceite esencial de *Juglans neotropica* Diels.

Determinación de la composición química

La composición química del aceite esencial extraído de las hojas de *Juglans neotropica* Diels fue analizada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) utilizando el equipo GC Thermo Finnigan, TRACE-MS Cuadrupolo con el método de inyección líquida. Se empleó una columna capilar RESTEK 5% diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m a una temperatura inicial de 80 °C. La velocidad de flujo utilizada fue de 1 ml/min, y se utilizó helio como gas de arrastre. Para la identificación de los compuestos químicos volátiles presentes en la muestra, se compararon los tiempos de retención y los datos espectrales con la librería NIST 2014.

Determinación de la actividad antioxidante in vitro por el método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•)

Se desarrolló la metodología propuesta por Blois ⁽⁸⁾, a partir de una solución stock al 40 % de 2,2-Difenil-1-Picril Hidrazilo se preparó una solución de trabajo en el rango de 0,6 a 0,7 de absorbancia. Este radical cromóforo de color violeta es estable, y cuando es reducido a hidracina se decolora a amarillo pálido a una longitud de onda de 517 nm. Este radical diluido se enfrentó con las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 μ l/ml de aceite esencial *Juglans neotropica* Diels.

Determinación de la actividad antioxidante in vitro por el método de captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)- 6-sulfónico (ABTS•+)

Se desarrolló la metodología de Re ⁽⁹⁾, la cual utiliza al radical catiónico ABTS^{•+}, 2,2'-azinobis (3-ácido etilbenzotiazolina-6-sulfónico), cromóforo azul-verdoso, que es inhibido a una longitud de onda de 734 nm por compuestos antioxidantes. Se preparó una solución de trabajo a partir de 3,92 mg/ml del radical ABTS^{•+} hasta llegar al rango de 0,680 - 0,720 de absorbancia. Este radical diluido se enfrentó con las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 μ l/ml de aceite esencial *Juglans neotropica* Diels.

Determinación de la actividad anti-*Candida albicans*

Se realizó una prueba de microdilución cuantitativa de la muestra del aceite esencial de *Juglans neotropica* Diels, para determinar la menor concentración capaz de inhibir el crecimiento de *Candida albicans* siguiendo los protocolos modificados de Liu *et al.* en 2007 ⁽¹⁰⁾. Se diluyó el aceite esencial en DMSO, adaptando el esquema de diluciones de drogas insolubles en agua de los protocolos CLSI M27-A2 ⁽¹¹⁾ en un rango de 0,078125 y 40 μ l/ml. Se usó como antifúngico de referencia al ketoconazol en concentraciones entre 0.0313 y 16 μ g/ml. La cepa de *Candida albicans* fue inoculada en agar dextrosa Sabouraud a 37°C, para luego diluir en solución salina al 0,85% hasta obtener $1,5 \times 10^6$ UFC/ml. Se usó microplacas de 96 pocillos, en cada pocillo se colocó 100 μ l de la muestra o referencia y 100 μ l de inóculo con indicador de resazurina 20 mg/ml y se realizó la lectura 24 horas después a una incubación de 37°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la composición química

El análisis cromatográfico de gases acoplado a espectrometría de masa reveló la presencia de diversos compuestos de interés como lo es el fitol, α -pineno, copaeno, α -caryophyllene, Germacrene D, entre otros. Cada compuesto presentó un tiempo de retención característico que se puede apreciar en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos cromatográficos de los compuestos químicos del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels

Componente	Tiempo de retención
α -pineno	1,02
D-limoneno	1,13
Copaeno	1,99
Copaeno	2,13
Biciclo[7.2.0]undec-4-eno,4,11,11-trimetil-8-metilen-, (1R,4Z,9S)-	2,35
α -caryophyllene	2,47
γ -Muralene	2,54
Germacrene D	2,61
alpha-muurolene (naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S,4aS,8aR)-)	2,64
Cis-asarone	2,88
Spathulenol	3,03
Aromadendrene oxide (2)	3,32
Phytol	5,25

La composición química del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels destaca la presencia de α -pineno, α -caryophyllene y D-limoneno, los cuales son característicos en el género *Juglans* ^(12,13), además, se encontró la presencia de α -Muralene, γ -Muralene y Germacrene D compuestos sesquiterpénicos estudiados gracias a su potencial antimicrobiano y antifúngico ⁽¹⁴⁾.

Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* por el método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH•)

El aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels exhibió una actividad antioxidante alta según el método DPPH• en un rango de 10 y 50 μ l/ml con un porcentaje de inhibición

de radicales libres del 14,26% y 48,18% respectivamente como se puede apreciar en la Tabla 2.

Tabla 2. Captación de radical libre DPPH• del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels

<i>Juglans neotropica</i> Diels (µL /ml)	Prom. Abs	%Inhibición DPPH•
0	0,4207	0,00
10	0,3607	14,26
20	0,3150	25,12
30	0,2817	33,04
40	0,2407	42,79
50	0,2180	48,18
IC 50 = 52,25 ul/ml		

La actividad antioxidante de los radicales libres depende de la estructura química y de la cantidad de los componentes químicos que poseen los aceites esenciales, uno de ellos son los compuestos dadores de hidrógeno y electrones ⁽¹⁵⁾. Uno de los componentes identificados por el análisis GC/MS, es el fitol, un diterpeno de los alcoholes cíclicos insaturados, que por la presencia de un doble enlace no conjugado no es un excelente dador de electrones, no obstante, es considerado un precursor de filoquinonas y tocoferoles los cuales son compuestos con gran capacidad antioxidante ⁽¹⁶⁾, además, el grupo hidroxilo del fitol podría estabilizar algunos radicales libres ⁽¹⁷⁾. Algunos autores sugieren que el fitol en un medio lipofílico puede tener acción más inhibitoria ⁽¹⁸⁾, una característica de los aceites esenciales es que la mayoría son solubles en alcoholes.

El copano ha sido un componente químico de otros aceites esenciales, los cuales han presentado en los métodos in vitro actividad antioxidante distantes a la de los estándares como el trolox y ácido ascórbico ⁽¹⁹⁾. En un aislamiento de α -pineno ha presentado un valor de IC₅₀ = 310 ug/ml en el método DPPH• ⁽²⁰⁾, lo cual indicaría y le estaría otorgando al aceite esencial un poder antioxidante muy inferior al estándar Trolox. En otras investigación el trolox ha presentado ABTS y DPPH inhibición del radical, tres veces mejor que el D-limoneno ha presentado en el método ⁽²¹⁾.

Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* por el método de captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbezotiazolin)- 6-sulfónico (ABTS•+)

El aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels exhibió una actividad antioxidante alta según el método ABTS•+ en un rango de 10 y 50 ul/ml con un porcentaje de inhibición de radicales libres del 22,50% y 63,03% respectivamente como se puede apreciar en la Tabla 3.

Tabla 3. Captación de radical catiónico ABTS•+ del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels

<i>Juglans neotropica</i> Diels (µL /ml)	Prom. Abs	%Inhibición ABTS•+
0	0,659	0,0000
10	0,5107	22,5038
20	0,3941	40,1973
30	0,3365	48,9378
40	0,2899	56,0091
50	0,2436	63,0349

IC 50 = 34,65 ul/ml

Los IC50 obtenidos fueron de 52,25 ul/ml y 34,65 ul/ml de aceite esencial *Juglans neotropica* Diels en los métodos DPPH• y ABTS•+, respectivamente. El estándar trolox presentó IC50 de $2,0219 \times 10^{-3}$ ul/ml en el método DPPH• y $2,649 \times 10^{-3}$ ul/ml en ABTS•+, lo cual indica que el aceite esencial de *Juglans neotropica* Diels si posee actividad antioxidante pero muy inferior al estándar. Los resultados de la presente investigación en ambos métodos muestra mejor inhibición del radical ABTS•+, este radical tiene mayor afinidad en los medios de reacción hidrofílicos y lipofílico, a diferencia del DPPH• caracterizado por el medio lipofílico ⁽²²⁾. Es importante resaltar que los compuestos bioactivos en conjunto pueden presentar acción sinérgica o antagónica, lo cual influye en la actividad inhibitoria de radicales libres ⁽²³⁾.

Determinación de la actividad anti-*Candida albicans*

El aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels exhibió una concentración mínima inhibitoria (CMI) de > 40 ul/ml a las 24 y 48 horas según la Tabla 4 por lo que no se considera que tenga una actividad anti-*Candida albicans* en las concentraciones ensayadas.

Tabla 4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropicans* Diels frente a *Candida albicans*

Tratamiento	<i>C. albicans</i> (24 h)	<i>C. albicans</i> (48 h)
Ceite esencial de <i>J. neotropicans</i> Diels	> 40 ul/ml	> 40 ul/ml
Ketoconazol	2 ug/ml	8 ug/ml

El aceite esencial de las hojas de *Juglans neotropica* Diels presentó un CMI de > 40 ul/ml a las 24 y 48 horas. por lo que se concluye que no tiene actividad anti-*Candida albicans* en las concentraciones ensayadas. El control ketoconazol también disminuyó su valor de CMI de 2 a 8 ul/ml, lo cual denota una actividad fungistática y no fungicida. Autores como Omar *et al.* (2001) estudiaron en Colombia la corteza de 14 árboles usados tradicionalmente para tratar infecciones cutáneas en búsqueda de nuevos antifúngicos, el extracto de corteza de árbol de *Juglans neotropica* Diels presentó una actividad anti-*Candida albicans* mínima, mientras que el extracto de corteza de árbol de *Juglans cinerea* tuvo el espectro más amplio de actividades contra *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus* de una magnitud más considerable⁽²⁴⁾. Reynaldo *et al.* (2021) realizaron un estudio sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels en Perú, determinaron un baja actividades contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, sin embargo, se deduce que la poca actividad que presenta es gracias a los hidrocarburos monoterpénicos, sesquiterpénicos y sus derivados oxigenados como el D-limoneno⁽²⁵⁾. Otros estudios afirman la baja actividad del aceite esencial de hojas del género *Juglans* frente a *Staphylococcus epidermidis* (15,62 ug/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (31,25 ug/ml) y *Staphylococcus aureus* (15,62 ug/ml) y *Candida albicans* (> 40 ul/ml)^(26,27).

CONCLUSIONES

Se logró evaluar la composición química del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels, siendo los compuestos de mayor importancia el α -pineno, D-limoneno y Copaeno; debido a que son característicos de la especie y con gran potencial antioxidante. La actividad antioxidante del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels se evaluó mediante los métodos DPPH• y ABTS•+ obteniendo un IC50 de 52,25 uL/mL y 34,65 uL/mL, respectivamente, evidenciando una alta capacidad antioxidante del aceite. Finalmente, la actividad anti-*Candida albicans* del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels exhibió una concentración mínima inhibitoria (CMI) de >40

uL/mL a las 24 y 48 horas, por lo tanto se evidencia una actividad nula de las concentraciones ensayadas.

AGRADECIMIENTO

Agradecer al Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara" y al Grupo de Investigación Recursos Naturales "RENATU" por brindar los laboratorios y equipos necesarios para realizar la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramírez F, Kallarackal J. The phenology of the endangered Nogal (*Juglans neotropica* Diels) in Bogota and its conservation implications in the urban forest. *Urban Ecosyst.* 2021;24(6):1327-1342.
2. Reynel C, Marcelo J. Árboles de los Ecosistemas Forestales Andinos. Manual de Identificación de Especies. Serie Investigación y Sistematización N°9. Lima: Programa Regional ECOBONA – INTERCOOPERATION. 2009.
3. Tit DM, Bungau SG. Antioxidant Activity of Essential Oils. *Antioxidants.* 2023;12(2):10-3. doi: 10.3390/antiox12020383.
4. Do Nascimento LD, de Moraes AAB, da Costa KS, Galúcio JMP, Taube PS, Costa Cml, et al. Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: New findings and potential applications. *Biomolecules.* 2020;10(7):998. doi: 10.3390/biom10070988.
5. Chen X, Shang S, Yan F, Jiang H, Zhao G, Tian S, et al. Antioxidant Activities of Essential Oils and Their Major Components in Scavenging Free Radicals, Inhibiting Lipid Oxidation and Reducing Cellular Oxidative Stress. *Molecules.* 2023;28(11):4559. doi: 10.3390/molecules28114559.
6. Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. *J Agric Food Chem.* 2013;61(46):10835-47.
7. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005;53(10):4290-302.
8. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;181(4617):1199-200.
9. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 2007;26(9/10):1231-7.
10. Liu M, Seidel V, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeast. *Methods.* 2007; 42: 325-329.
11. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2008.
12. Panth N, Paudel KR, Karki R. Phytochemical profile and biological activity of *Juglans regia*. *J Integr Med.* 2016;14(5):359-373.

13. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira ICFR, et al. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(11):2287-2295.
14. St-Gelais A, Mathieu M, Levasseur V, Ovando JF, Escamilla R, Marceau H. Preisocalamendiol, shyobunol and related oxygenated sesquiterpenes from Bolivian *Schinus molle* Essential Oil. *Nat Prod Commun.* 2016;11(4):547-550.
15. Olszowy M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiol Biochem.* Elsevier Masson SAS; 1 nov 2019;144:135-43.
16. Thejanuo Rhetso, R. Shubharani, M. Roopa, V. Sivaram. Chemical constituents, antioxidant, and antimicrobial activity of *Allium chinense* G. Don. *Future J Phar Sci.* 2020 Nov 27;6: 102. doi: 10.1186/s43094-020-00100-7.
17. Islam MT, Ali ES, Uddin SJ, Shaw S, Islam MA, Ahmed MI, et al.. *Phytol: A review of biomedical activities.* *Food Chem Toxicol.* 2018 Nov;121:82-94.
18. Islam T, Streck L, Correia MF, de Castro JM, Oliveira MV, Oliveira AM, et al. Preparation of Phytol-Loaded Nanoemulsion and Screening for Antioxidant Capacity. *Int Arch Med.* 2016; 9(70). doi: 10.3823/1941.
19. Huaraca R, Delgado MDC, Tapia F, Nolasco G. Perfil químico y actividad antioxidante de aceites esenciales de hierbas aromáticas altoandinas del Perú. *Rev Alfa.* 2021;5(14):153-65.
20. Bouzenna H, Hfaiedh N, Giroux-Metges MA, Elfeki A, Talarmin H. Potential protective effects of alpha-pinene against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. *Biomed Pharmacother.* 2017 Sep;93:961-968.
21. Shah BB, Mehta AA. In vitro evaluation of antioxidant activity of D-Limonene. *Asian J Pharm Pharmacol.* 2018;4(6):883-7.
22. Cano A, Maestre AB, Hernández-Ruiz J, Arnao MB. ABTS/TAC Methodology: Main Milestones and Recent Applications. *Processes.* 2023;11(1): 185. doi: 10.3390/pr11010185.
23. Efferth T, Koch E. Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. *Curr Drug Targets.* 2010;12(1):122-32.
24. Omar S, Lemonnier B, Jones N, Ficker C, Smith ML, Neema C, Towers GH, Goel K, Arnason JT. Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2000 Nov;73(1-2):161-70.
25. Ruiz J, Salazar ME. Composición química y actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Citrus paradisi*, *Juglans neotropica* Diels, *Schinus molle* y *Tagetes elliptica* Smith. *Rev Soc Quím Perú.* 2021; 87(3): 228-241.
26. Rather MA, Dar BA, Dar MY, Wani BA, Shah WA, Bhat BA, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. *Phytomedicine.* 2012 Oct 15;19(13):1185-90.
27. Bardales-Chuquilin AMT, Ureta-Lumbe YMS. Actividad antifúngica con infusión de *Juglans neotropica* Diels (nogal) en colonias de *Candida albicans* (ATCC 10231). [Tesis de título]. Cajamarca: Universidad Privada Antonio Guillermo Urrello; 2017.