

## Composition of essential oil of *Schinus molle* L. leaves affected by extraction time and scale-up process

## Composición de aceite esencial de hojas de *Schinus molle* L. afectada por el tiempo de extracción y escalamiento del proceso

Ulises Murrieta-Dionicio<sup>1</sup>; Jessica M. Medrano-Hernández<sup>2</sup>; Diana Guerra-Ramírez<sup>2</sup>; Salvador Valle-Guadarrama<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Preparatoria Agrícola, Laboratorio de Productos Naturales. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

\*Corresponding author: [svalleg@taurus.chapingo.mx](mailto:svalleg@taurus.chapingo.mx); tel.: +52 595 952 1629.

### Abstract

**Introduction:** *Schinus molle* L. (Anacardiaceae), known as pirul tree in Mexico, is a species rich in essential oil in leaves and fruits.

**Objective:** To characterize the phytochemical profile of essential oil obtained from *S. molle* leaves using two distillation systems and different extraction times.

**Materials and methods:** An intermediate scale Rayleigh batch distiller was used to extract essential oil from *S. molle* leaves collected in the central region of Mexico. The product obtained at different times was characterized by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The phytochemical profile was compared with the extract obtained in the Clevenger apparatus.

**Results and discussion:** The Rayleigh distiller had a higher extraction capacity, but the yield was 0.6 % lower ( $P = 0.05$ ) than with the Clevenger apparatus at 120 min. A total of 37 compounds were found, of which 31 were present in the extract from the Rayleigh distiller, five were compounds of low concentration and one, classified as oxygenated sesquiterpene, had a high concentration (10.25 %) of essential oil. With longer extraction time, sesquiterpenes increased and oxygenated sesquiterpenes decreased. The essential oil had higher presence of hydrogenated monoterpenes, mainly  $\alpha$ -phellandrene (21.20-28.57 %), limonene +  $\beta$ -phellandrene (19.07-27.78 %), camphene (3.32-9.93 %),  $\alpha$ -pinene (5.74-8.56 %),  $\beta$ -mircene (2.95-6.91 %) and  $\beta$ -pinene (1.31-3.55 %).

**Conclusions:** The characterization of the extraction procedure and chemical profile of essential oil of *S. molle* can favor the exploitation of this species.

**Keywords:** Clevenger apparatus; Rayleigh distillation; phytochemical profile; pirul tree; terpenes.

### Resumen

**Introducción:** *Schinus molle* L. (Anacardiaceae), conocido como pirul en México, es una especie rica en aceite esencial en hojas y frutos.

**Objetivo:** Caracterizar el perfil fitoquímico de aceite esencial obtenido de hojas de *S. molle* mediante dos sistemas de destilación y distintos tiempos de extracción.

**Materiales y métodos:** Se utilizó un destilador discontinuo Rayleigh de escala intermedia para extraer aceite esencial de hojas de *S. molle* colectadas en la región central de México. El producto obtenido a distintos tiempos se caracterizó mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). El perfil fitoquímico se comparó con extracto obtenido en aparato Clevenger.

**Resultados y discusión:** El destilador Rayleigh tuvo mayor capacidad de extracción, pero el rendimiento fue 0.6 % menor ( $P = 0.05$ ) que con el aparato Clevenger a los 120 min. En total se encontraron 37 compuestos, de los cuales 31 estuvieron presentes en el extracto obtenido con destilador Rayleigh, cinco fueron compuestos de baja concentración y uno, catalogado como sesquiterpeno oxigenado, tuvo alta concentración (10.25 %) en el aceite esencial. Con mayor tiempo de extracción, los sesquiterpenos incrementaron y los sesquiterpenos oxigenados disminuyeron. El aceite esencial tuvo presencia mayoritaria de monoterpenos hidrogenados, principalmente de  $\alpha$ -felandreno (21.20-28.57 %), limoneno +  $\beta$ -felandreno (19.07-27.78 %), canfeno (3.32-9.93 %),  $\alpha$ -pineno (5.74-8.56 %),  $\beta$ -mirceno (2.95-6.91 %) y  $\beta$ -pineno (1.31-3.55 %).

**Conclusiones:** La caracterización del procedimiento de extracción y del perfil químico del aceite esencial de *S. molle* puede favorecer el aprovechamiento de esta especie.

**Palabras clave:** aparato Clevenger; destilación Rayleigh; perfil fitoquímico; pirul; terpenos.

## Introduction

The genus *Schinus* (Anacardiaceae) includes species producing essential oils with a pleasant spicy aroma. Some have been subjected to studies about their composition and, among them, *S. terebinthifolius* Raddi and *S. molle* L. have been of great interest (dos Santos et al., 2009) because of their insecticidal (Abdel-Sattar et al., 2010), antimicrobial (Chávez-Magdaleno et al., 2018; Scopel et al., 2013), nutraceutical (Guzzo et al., 2019) and allelopathic (Zahed et al., 2010) properties.

*S. molle* is a native tree found in subtropical regions and can be located in several countries (Awadh et al., 2011; Gomes et al., 2013; Huerta et al., 2010; Phiri et al., 2021; Volpini-Klein et al., 2021). In Mexico, *S. molle* is known as pirul tree and is a non-cultivated species that is part of the natural landscape in many regions. In several areas of the world, the essential oil of *S. molle* has been characterized for its composition (Gomes et al., 2013; Pereira et al., 2019; Phiri et al., 2021; Volpini-Klein et al., 2021), which can vary among plant populations (Gomes et al., 2013). In this regard, the phytochemical profile of the essential oil of leaves or fruits of *S. molle* from Mexico has not been studied and the generation of this knowledge may favor its exploitation.

Essential oils are complex mixtures of volatile compounds produced by some plant species (Franz & Novak, 2016), whose composition is characterized by the presence of terpenes (monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes), alcohols, esters, aldehydes, ketones, amines, oxides and lactones (Shankar et al., 2021). Based on their antimicrobial (Combrinck et al., 2011; Tabassum & Vidyasagar, 2013) and insecticidal (Reyes-Guzman et al., 2012) activities, essential oils have attracted much attention to be used in natural pest and disease control strategies in agricultural and food production (Combrinck et al., 2011). Specifically, there is interest in the development of agents with insect repellent properties (Islam et al., 2017), for the control of disease transmission vectors such as chikungunya and zika (Carpio-Orantes, 2016), insect control in greenhouses (da Camara et al., 2015) and grain stores (Reyes-Guzman et al., 2012), pest control in tree species (Flores-Villegas et al., 2019), control of fungi, bacteria and yeasts causing fruit diseases at postharvest (Rico et al., 2012; Valle-Ortiz et al., 2019) and even for the reduction of viral diseases (Adamski & Adamska, 2021; da Silva et al., 2020).

It has been shown that, in addition to the effect of the tree's development site, the composition of *S. molle* essential oil varies depending on the time of year when the plant material is collected (Pereira et al., 2019; Volpini-Klein et al., 2021), the extraction method and even the extraction time (Volpini-Klein et al., 2021). On the other hand, essential oils in general and of *S. molle*

## Introducción

El género *Schinus* (Anacardiaceae) incluye especies productoras de aceites esenciales con aroma especiado agradable. Algunas han sido sometidas a estudios de su composición y, entre ellas, *S. terebinthifolius* Raddi y *S. molle* L. han atraído mayor interés (dos Santos et al., 2009) por sus propiedades insecticidas (Abdel-Sattar et al., 2010), antimicrobianas (Chávez-Magdaleno et al., 2018; Scopel et al., 2013), nutraceuticas (Guzzo et al., 2019) y otras con efecto alelopático (Zahed et al., 2010).

*S. molle* es un árbol nativo de regiones subtropicales y es posible encontrarlo en varios países (Awadh et al., 2011; Gomes et al., 2013; Huerta et al., 2010; Phiri et al., 2021; Volpini-Klein et al., 2021). En México, *S. molle* es conocido como pirul y es una especie no cultivada que forma parte del paisaje natural de muchas regiones. En varias áreas del mundo, el aceite esencial de *S. molle* ha sido caracterizado en términos de su composición (Gomes et al., 2013; Pereira et al., 2019; Phiri et al., 2021; Volpini-Klein et al., 2021), la cual puede variar entre poblaciones vegetales (Gomes et al., 2013). Al respecto, el perfil fitoquímico del aceite esencial de hojas o frutos de *S. molle* de México no ha sido estudiado y la generación de este conocimiento puede favorecer su explotación.

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles producidos por algunas especies vegetales (Franz & Novak, 2016), cuya composición está caracterizada por la presencia de terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos), alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, aminas, óxidos y lactonas (Shankar et al., 2021). Debido a su actividad antimicrobiana (Combrinck et al., 2011; Tabassum & Vidyasagar, 2013) e insecticida (Reyes-Guzmán et al., 2012), los aceites esenciales han atraído mucha atención para ser usados en estrategias naturales de control de plagas y enfermedades en la producción agrícola y de alimentos (Combrinck et al., 2011). De forma específica, existe interés por el desarrollo de agentes con propiedades de repelencia a insectos (Islam et al., 2017), para el control de vectores de transmisión de enfermedades como chikunguña y zika (Carpio-Orantes, 2016), control de insectos en invernaderos (da Camara et al., 2015) y almacenes de granos (Reyes-Guzmán et al., 2012), control de plagas en especies arbóreas (Flores-Villegas et al., 2019), control de hongos, bacterias y levaduras causantes de enfermedades en frutos en postcosecha (Rico et al., 2012; Valle-Ortiz et al., 2019) e incluso para la reducción de enfermedades virales (Adamski & Adamska, 2021; da Silva et al., 2020).

Se ha demostrado que, además del efecto del lugar de desarrollo del árbol, la composición del aceite esencial de *S. molle* varía en función de la época del año en que el material vegetal se colecta (Pereira et al., 2019; Volpini-

more specifically, have been commonly characterized with support of Clevenger apparatus (Chávez-Magdaleno et al., 2018; Gomes et al., 2013; Pereira et al., 2019; Volpini-Klein et al., 2021), but this is a laboratory-level device that contributes small amounts of product and the commercial level requires larger-scale handling. In this regard, Rayleigh batch distillation allows the extraction of essential oils with large volumes (Seader et al., 2011) and, therefore, may have greater potential for the exploitation of aromatic species, by obtaining larger quantities for commercialization. However, the effect of scaling on the chemical composition of the essential oil is unknown. Therefore, the objective of this study was to characterize the phytochemical profile of the essential oil of *S. molle* leaves collected in the central region of Mexico and treated under different extraction conditions, to improve the potential use of this species.

## Materials and Methods

### Plant material

*S. molle* leaves were used, which were collected at the Universidad Autónoma Chapingo (19° 29' 24" N, 98° 53' 26" W, 2 250 m elevation) located in Texcoco, Mexico, during the months of November and December 2018, characterized by average maximum temperature of 22 °C, average minimum temperature of 7 °C, cloudiness between 33 and 44 %, and precipitation between 7 and 24 mm. Leaves were cut in their first weeks of development based on the degree of coloration and free of dirt and damage by physical or biological factors. Dry matter content was determined by oven drying (Thermo Scientific 3478, USA) at 33 °C for 9 days until constant weigh.

### Extraction of essential oil

Two extraction systems were used. One was the Clevenger apparatus, where a hydrodistillation procedure was carried out with 100 g of plant material in 450 mL of boiling water. The second apparatus was a Rayleigh-type batch distillation column (Seader et al., 2011), with a depletion section consisting of a 50 L vessel and an enrichment phase consisting of five boiling plates (Figure 1). In this system, 10 L of water were poured into the depletion vessel and steam heating from a boiler was applied to bring the liquid to a near boiling condition. The plant material was fed in 2 kg batches placed in small organza bags.

In both systems, the essential oil was recovered through separation by density difference in a collecting vessel, weighed and stored in airtight containers at 5 °C until further analysis. In the Clevenger apparatus, extraction was performed at two times, 60 and 120 min. In the Rayleigh distillation column, process times of 20, 40, 60, 80, 100 and 120 min were evaluated.

Klein et al., 2021), del método e incluso en función del tiempo de extracción (Volpini-Klein et al., 2021). Por otro lado, los aceites esenciales en general y de *S. molle* en particular se han caracterizado comúnmente con apoyo de equipo Clevenger (Chávez-Magdaleno et al., 2018; Gomes et al., 2013; Pereira et al., 2019; Volpini-Klein et al., 2021), pero este es un dispositivo de nivel laboratorio que aporta cantidades pequeñas de producto y a nivel comercial se requiere de un manejo a escala mayor. Al respecto, la destilación discontinua Rayleigh permite la extracción de aceites esenciales con volúmenes grandes (Seader et al., 2011) y, por tanto, puede tener mayor potencial para el aprovechamiento de especies aromáticas, a través de la obtención de cantidades mayores para la comercialización. No obstante, el efecto del escalamiento sobre la composición química del aceite esencial se desconoce. En este sentido, el objetivo del trabajo fue caracterizar el perfil fitoquímico de aceite esencial de hojas de *S. molle* colectadas en la región central de México y tratadas con distintas condiciones de extracción, para favorecer el potencial de aprovechamiento de esta especie.

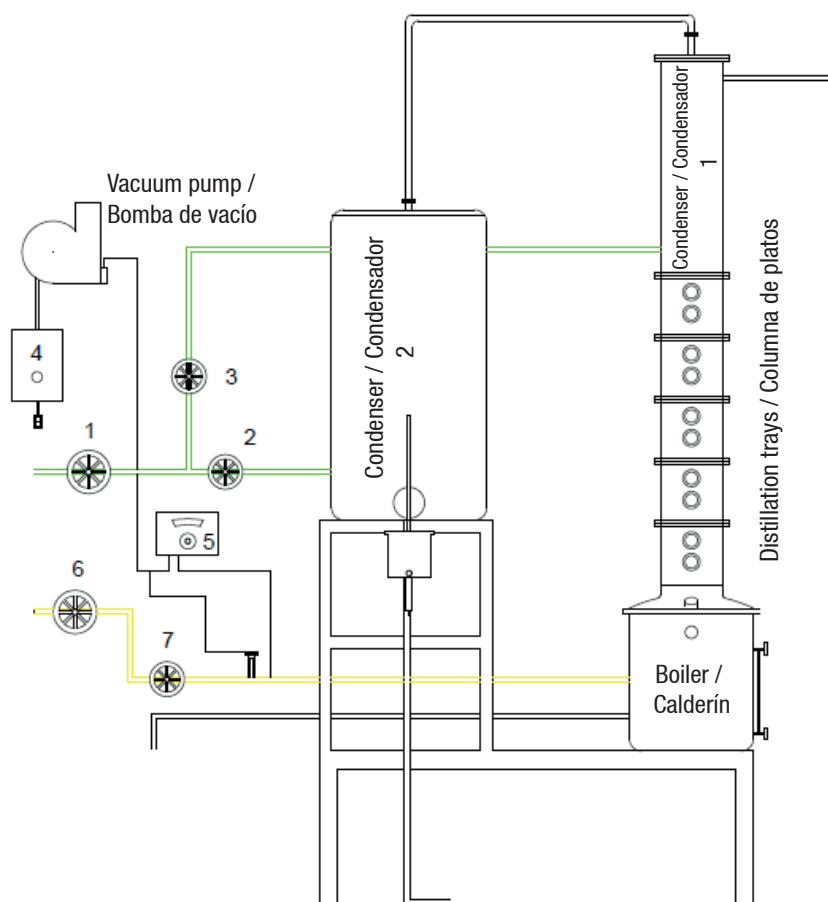
## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se usaron hojas de *S. molle* colectadas en la Universidad Autónoma Chapingo (19° 29' 24" N, 98° 53' 26" O, 2 250 m de elevación) ubicada en Texcoco, México, durante los meses de noviembre y diciembre de 2018, caracterizados por tener temperatura máxima promedio de 22 °C, temperatura mínima promedio de 7 °C, nubosidad entre 33 y 44 % y precipitación entre 7 y 24 mm. Las hojas se cortaron en sus primeras semanas de desarrollo con base en el grado de coloración y libres de suciedad y daños por factores físicos o biológicos. El contenido de materia seca se determinó mediante secado en estufa (Thermo Scientific 3478, EUA) a 33 °C por 9 días hasta lograr peso constante.

### Extracción de aceite esencial

Se utilizaron dos sistemas de extracción. Uno de ellos fue el aparato Clevenger, donde se realizó un procedimiento de hidrodestilación con 100 g de material vegetal en 450 mL de agua en ebullición. El segundo equipo fue una columna de destilación de operación discontinua tipo Rayleigh (Seader et al., 2011), con sección de agotamiento formada por un recipiente de 50 L y una fase de enriquecimiento formada por cinco platos de ebullición (Figura 1). En este sistema, se vertieron 10 L de agua en el recipiente de agotamiento y se aplicó calefacción con vapor proveniente de caldera para llevar el líquido hasta una condición cercana a ebullición. El material vegetal se alimentó en lotes de 2 kg colocados en pequeños sacos de tela organza.



**Figure 1.** Representation of a Rayleigh batch distillation column. The numbers indicate general water supply (1), cooling water to condensers (2,3), vacuum pump starter (4), temperature recorder (5) and heating steam control valves (6, 7).

**Figura 1.** Representación de columna de destilación discontinua tipo Rayleigh. Los números indican alimentación general de agua (1), agua de enfriamiento a condensadores (2,3), sistema de encendido de bomba de vacío (4), termómetro de registro de temperatura de trabajo (5) y válvulas de control de vapor de calefacción (6, 7).

Extraction volume and oil composition were determined at each time. All routines were performed in triplicate. The operation in the Clevenger apparatus was used as a reference to evaluate the operation of the Rayleigh distiller.

#### Evaluating the composition of the essential oil

Gas chromatography equipment (Agilent Technologies® 7890A, USA) coupled to an Ion Tramp 240MS mass selective detector (Agilent Technologies®, USA), fitted with a 30 m long, 0.25  $\mu\text{m}$  inner diameter and 0.25 mm outer diameter VF-5ms capillary column was used. The carrier gas was helium with inlet pressure of 7.91 psi and flow rate of 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Electron impact mass detector with electron emission current of 10  $\mu\text{A}$  and ionization time of 25 ms was used. The oven was programmed at initial temperature of 50  $^{\circ}\text{C}$  for 5 min, with subsequent increase of 5  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  until 150  $^{\circ}\text{C}$  was reached, and finally, the thermal

En ambos sistemas, el aceite esencial se recuperó mediante separación por diferencia de densidad en un recipiente colector, se pesó y se almacenó en recipientes herméticos a 5  $^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis posterior. En el aparato Clevenger se realizó la extracción a dos tiempos, 60 y 120 min. En la columna de destilación Rayleigh se evaluaron tiempos de proceso de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min. En cada tiempo se determinó volumen de extracción y composición del aceite. Todas las rutinas se realizaron por triplicado. La operación en aparato Clevenger se usó como referencia para evaluar la operación del destilador tipo Rayleigh.

#### Evaluación de la composición del aceite esencial

Se usó un equipo de cromatografía de gases (Agilent Technologies® 7890A, EUA) acoplado a un detector selectivo de masas Ion Tramp 240MS (Agilent Technologies®, EUA), provisto de una columna capilar VF-5ms de 30 m de largo, 0.25  $\mu\text{m}$  de diámetro interno

condition was increased at the rate of 20 °C·min<sup>-1</sup> until 250 °C. The temperature in the injector, trap and transfer line was 250 °C. The sample was prepared by diluting 2 µL of essential oil in a final volume of 1 mL of HPLC-grade hexane. Injections were made into the equipment in triplicate. The run time was 30 min. Compounds were identified by comparing retention indices (RI) with literature data and their mass spectra with NIST (National Institute of Standards and Technology) data stored in the computer library of the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system. The C8-C22 alkanes (Sigma®) were used as reference points in the calculation of RIs, using the Kovats method (Dool & Kratz, 1963). The results were expressed as fragment ion counts on the mass selective detector.

### Data analysis

According to the chromatographic analysis, five groups of terpenic compounds were identified. Yield and relative concentration data in the Clevenger and Rayleigh extracts for extraction times of 60 and 120 min were subjected to analysis of variance in a 2<sup>2</sup> factorial arrangement, using a completely randomized design, and to tests of comparison of treatment means with Tukey's statistic ( $P = 0.05$ ). Furthermore, yield data and relative concentration of compounds in the extracts from the Rayleigh equipment, taken at times from 20 to 120 min, were subjected to analysis of variance in congruent form with a 6×5 factorial arrangement in a completely randomized design and to mean comparison routines with Tukey's statistic ( $P = 0.05$ ), to evaluate the variation of each group of compounds depending on extraction time. All analysis was carried out with the SAS software (SAS Institute Inc., 1999).

## Results and Discussion

### Extraction yield

*S. molle* leaves had a dry matter of 35.98 ± 0.41 %. The variability in this characteristic was considered low and thus it was accepted that the plant material was homogeneous. Figure 2 shows that increasing the processing time favored obtaining higher amounts ( $P \leq 0.05$ ) of essential oil, which was an expected result that translated into higher extraction yield. The effect of time was greater in the Clevenger apparatus operation, where the yield increased at a rate of 0.0109 %·min<sup>-1</sup>, while in the Rayleigh distiller, the change occurred at a rate of 0.0069 %·min<sup>-1</sup>. According to Table 1, the extraction yield was similar in the two distillers after completing 60 min of operation, but with 120 min of process, the Clevenger apparatus allowed higher oil recovery efficiency than the Rayleigh distiller,

y 0.25 mm de diámetro externo. El gas de arrastre fue helio con presión de entrada de 7.91 psi y caudal de 1 mL·min<sup>-1</sup>. Se usó detector de masas de impacto electrónico con corriente de emisión de electrones de 10 µA y tiempo de ionización de 25 ms. El horno se programó a temperatura inicial de 50 °C por 5 min, con incremento posterior de 5 °C·min<sup>-1</sup> hasta llegar a 150 °C y, finalmente, la condición térmica se incrementó a razón de 20 °C·min<sup>-1</sup> hasta 250 °C. La temperatura en el inyector, trampa y línea de transferencia fue de 250 °C. La muestra se preparó diluyendo 2 µL de aceite esencial en un volumen final de 1 mL de hexano grado HPLC. Se hicieron inyecciones al equipo por triplicado. El tiempo de corrida fue de 30 min. Los compuestos se identificaron mediante comparación de los índices de retención (RI) con datos de la literatura y sus espectros de masas con los datos del NIST (National Institute of Standards and Technology) almacenados en la biblioteca del ordenador del sistema de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). Los alcanos C8-C22 (Sigma®) se usaron como puntos de referencia en el cálculo de los RI, utilizando el método de Kovats (Dool & Kratz, 1963). Los resultados se expresaron en términos de contabilidad de iones fragmentados en el detector selectivo de masas.

### Análisis de datos

Con base en el análisis cromatográfico se identificaron cinco grupos de compuestos terpénicos. Los datos de rendimiento y concentración relativa en los extractos de los equipos Clevenger y Rayleigh para tiempos de extracción de 60 y 120 min se sometieron a análisis de varianza en forma congruente con un arreglo factorial 2<sup>2</sup>, alojado en un diseño completamente al azar, y a pruebas de comparación de medias de tratamiento con el estadístico de Tukey ( $P = 0.05$ ). Asimismo, los datos de rendimiento y concentración relativa de compuestos en los extractos del equipo Rayleigh, obtenidos a los tiempos de 20 a 120 min, se sometieron a análisis de varianza en forma congruente con un arreglo factorial 6×5 alojado en un diseño completamente al azar y a rutinas de comparación de medias con el estadístico de Tukey ( $P = 0.05$ ), para evaluar la variación de cada grupo de compuestos en función del tiempo de extracción. Todo el análisis se realizó con el programa SAS (SAS Institute Inc., 1999).

## Resultados y discusión

### Rendimiento de extracción

Las hojas de *S. molle* tuvieron materia seca de 35.98 ± 0.41 %. La variabilidad en esta característica se consideró baja y con ello se aceptó que el material vegetal era homogéneo. La Figura 2 muestra que el aumento del tiempo de proceso favoreció la obtención

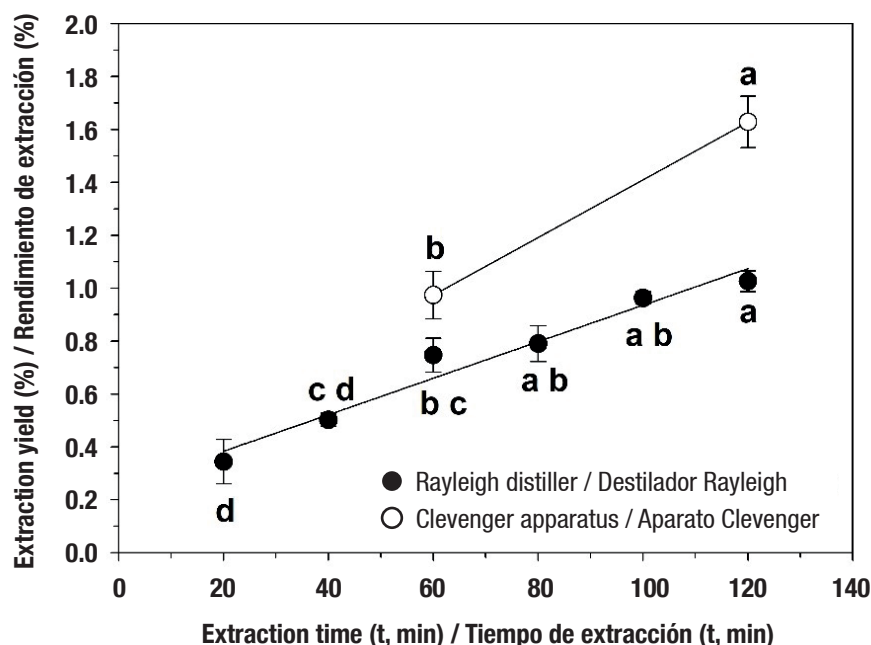


Figure 2. Variation of *Schinus molle* essential oil extraction yield in Clevenger apparatus and Rayleigh distiller depending on process operation time. Symbols correspond to mean values ( $n = 3$ ) and the variation bars to standard errors. Different letters indicate significant difference (Tukey,  $P = 0.05$ ) within the operation of each equipment.

Figura 2. Variación del rendimiento de extracción de aceite esencial de *Schinus molle* en aparato Clevenger y destilador Rayleigh en función del tiempo de operación de proceso. Los símbolos corresponden a valores medios ( $n = 3$ ) y las barras de variación a errores estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey,  $P = 0.05$ ) al interior de la operación de cada equipo.

Table 1. Comparison of means of the amount of essential oil extracted and the extraction yield from samples of 100 g and 2.0 kg of *Schinus molle* leaves subjected to hydrodistillation in Clevenger apparatus and Rayleigh distiller, respectively.

Cuadro 1. Comparación de medias de la cantidad de aceite esencial extraído y del rendimiento de extracción, a partir de muestras de 100 g y 2.0 kg de hojas de *Schinus molle* sometidas a hidrodestilación en aparato Clevenger y destilador Rayleigh, respectivamente.

Time/Tiempo	Devices/Equipo		HSD/DSH	CV (%)
	Clevenger	Rayleigh		
Extracted essential oil (g)/Aceite esencial extraído (g)				
60 min	0.350 ± 0.032 B b	5.374 ± 0.486 B a	1.352	20.841
120 min	0.585 ± 0.034 A b	7.381 ± 0.603 A a	1.677	18.574
HSD	0.131	1.854		
CV (%)	12.411	14.874		
Extraction yield (%) / Rendimiento de extracción (%)				
60 min	0.974 ± 0.089 B a	0.746 ± 0.067 B a	0.311	15.951
120 min	1.628 ± 0.096 A a	1.025 ± 0.083 A b	0.355	11.824
HSD	0.366	0.268		
CV (%)	12.411	14.874		

Based on Tukey's honest significant difference (HSD) ( $P = 0.05$ ), different capital letters in a column indicate significant difference depending on time and different small letters in a row indicate significant difference between teams. CV: coefficient of variation. ± standard error of the mean ( $n = 3$ ).

Con base en la diferencia significativa honesta (DSH) de Tukey ( $P = 0.05$ ), letras mayúsculas distintas en una columna indican diferencia significativa en función del tiempo y letras minúsculas distintas en una fila indican diferencia significativa entre equipos. CV: coeficiente de variación. ± error estándar de la media ( $n = 3$ ).

with values of 1.63 and 1.03 %, respectively. For the same extraction time and using Clevenger apparatus, Volpini-Klein et al. (2021) reported 0.6 % oil extraction yield from *S. molle* leaves collected in Naviraí, Brazil. However, even with higher extraction yields, the Clevenger apparatus has its main application at the laboratory level, for obtaining small samples for qualitative analysis of essential oils. On the contrary, the Rayleigh distiller allows the processing of significantly larger quantities of plant material to provide higher proportions of oil, which can be useful for commercial implementation on a larger scale. If a process time of 2 h is taken as a reference, and based on the data in Table 1, it is estimated that more than 12 extraction routines with the Clevenger apparatus may be required to obtain the same amount of essential oil generated by the Rayleigh distiller.

### Essential oil composition

The essential oils were analyzed qualitatively by GC-MS. Figure 3 shows one of the chromatograms corresponding to a sample of the extract obtained in the Clevenger apparatus with 120 min of processing.

de cantidades mayores ( $P \leq 0.05$ ) de aceite esencial, lo cual era un resultado esperado que se tradujo en mayor rendimiento de extracción. El efecto del tiempo fue mayor en la operación con aparato Clevenger, donde el rendimiento incrementó a razón de  $0.0109 \text{ \%}\cdot\text{min}^{-1}$ , mientras que en el destilador Rayleigh, el cambio ocurrió a razón de  $0.0069 \text{ \%}\cdot\text{min}^{-1}$ . De acuerdo con el Cuadro 1, el rendimiento de extracción fue similar en los dos destiladores al completarse 60 min de operación, pero con 120 min de proceso, el aparato Clevenger permitió mayor eficiencia de recuperación de aceite que el destilador Rayleigh con valores de 1.63 y 1.03 %, respectivamente. Para el mismo tiempo de extracción y usando aparato Clevenger, Volpini-Klein et al. (2021) obtuvieron 0.6 % de rendimiento de extracción de aceite a partir de hojas de *S. molle* colectadas en Naviraí, Brasil. No obstante, aun con mayor rendimiento de extracción, el aparato Clevenger tiene su principal aplicación a nivel laboratorio, en la obtención de muestras pequeñas destinadas al análisis cualitativo de aceites esenciales. En contraste, el destilador Rayleigh permite el procesamiento de cantidades significativamente mayores de material vegetal con el que pueden obtenerse proporciones superiores de

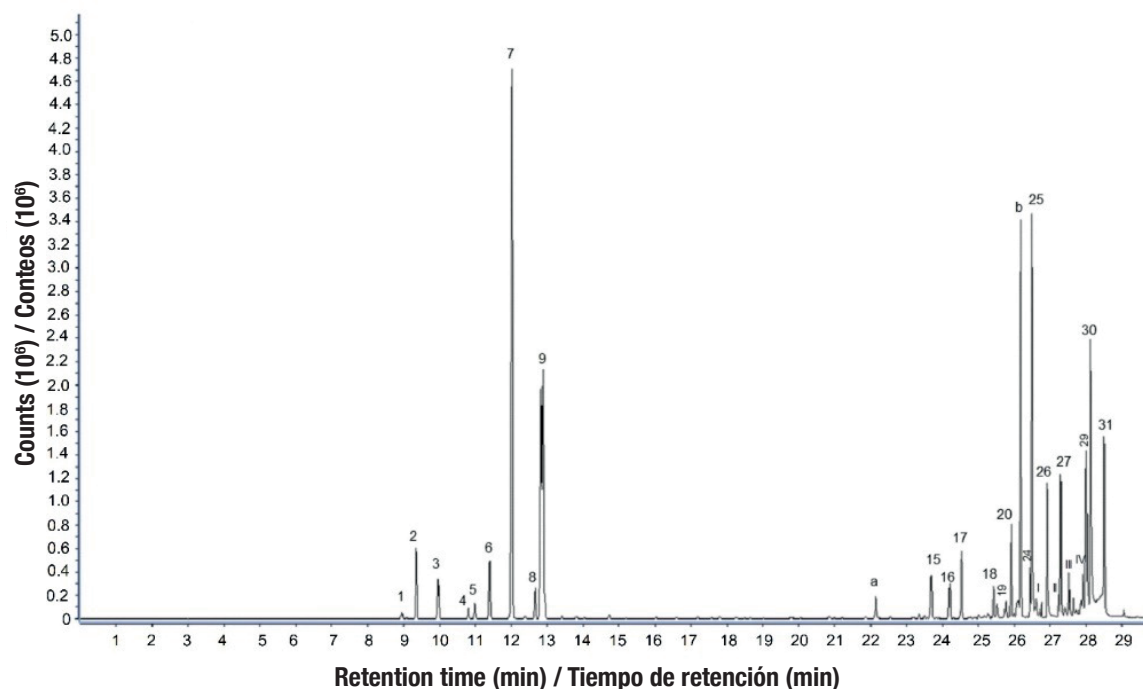


Figure 3. Chromatogram by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of *Schinus molle* essential oil extracted with Clevenger apparatus in a 120 min process. The Arabic numerals correspond to compounds also detected with Rayleigh distiller. Roman numerals were assigned to compounds identified only in Clevenger apparatus extract. Letters a and b indicate compounds recorded only with 120 min operation in Clevenger apparatus. The identity of the numbered compounds is specified in Table 2.

Figura 3. Cromatograma obtenido por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) correspondiente a aceite esencial de *Schinus molle* extraído con aparato Clevenger en un proceso de 120 min. Los números arábigos corresponden a compuestos detectados también con destilador Rayleigh. Los números romanos se asignaron a compuestos identificados solo en extracto de aparato Clevenger. Las letras a y b indican compuestos registrados solo con operación de 120 min en aparato Clevenger. La identidad de los compuestos numerados se especifica en el Cuadro 2.

The relative percentages of the components identified in the essential oil of *S. molle* leaves are shown in Table 2 for the two devices used and for different extraction times. A total of 37 compounds were found, of which 31 were present in the oil obtained with the Rayleigh distiller. Four of the compounds found only in the Clevenger extract, labeled with Roman numerals in Figure 3 and Table 2, were obtained at both extraction times (60 and 120 min); however, their identity was not determined, and they were compounds present in low proportion. The other two compounds were also obtained only with the Clevenger distiller with extraction time of 120 min. One of them was labeled with the letter *a* and identified as  $\gamma$ -elemene. The other, labeled *b*, was not precisely identified and was categorized as an oxygenated sesquiterpene. Thus, in terms of number of compounds, the phytochemical profile of the essential oil with Rayleigh distiller, operated for 60 min, was 88.6 % similar to that obtained with Clevenger distiller, which constitutes the reference system, and 83.8 % similar with an operation time of 120 min. On the other hand, the similarity was 96.2 % for an extraction time of 60 min, since the compounds labeled with Roman numeral had low concentration, but it was reduced to 87.2 % with a time of 120 min, which because the compound labeled with the letter *b* and identified as an oxygenated sesquiterpene, had a participation of 10.25 % in the oil. In this sense, if the Rayleigh equipment constitutes a modality that could be used in areas of *S. molle* development, due to the potential for extraction of larger quantities of essential oil, it will be necessary to address three aspects: first, verify the identity of the compounds that were only obtained with the Clevenger distiller; second, evaluate the biological activity of these compounds to determine the importance of their presence in the extracted oil; and, third, improve the operation of the Rayleigh distiller to increase the similarity with the oil obtained with the Clevenger distiller.

Regarding the compounds found in the oils extracted with the two devices, 16 were fully identified. From the rest, nine were not precisely identified, but were catalogued within the group of sesquiterpenes (three) and oxygenated sesquiterpenes (six) based on molecular weight. In general, five groups of terpene compounds were identified: monoterpenes, oxygenated monoterpenes, sesquiterpenes, oxygenated sesquiterpenes and other compounds; Table 3 shows their relative composition under the extraction conditions evaluated. According to Table 4, the statistical analysis showed differences in the overall relative participation of each group. Among the identified compounds, the group with the highest presence was monoterpenes (66.16-78.40 %), followed by oxygenated sesquiterpenes, then by sesquiterpenes and, finally, by oxygenated monoterpenes in small concentration. Similarly, Volpini-Klein et al. (2021)

aceite, lo cual puede ser útil para la implementación comercial de mayor escala. Si se toma como referencia un tiempo de proceso de 2 h, y con base en los datos del Cuadro 1, se calcula que pueden requerirse más de 12 rutinas de extracción con el aparato Clevenger para obtener la misma cantidad de aceite esencial generada por el destilador Rayleigh.

### Composición de aceite esencial

Los aceites esenciales se analizaron cualitativamente por GC-MS. La Figura 3 presenta uno de los cromatogramas correspondiente a una muestra del extracto obtenido en aparato Clevenger con 120 min de proceso. Los porcentajes relativos de los componentes identificados en el aceite esencial de hojas de *S. molle* se presentan en el Cuadro 2 para los dos equipos utilizados y para distintos tiempos de extracción. En total se encontraron 37 compuestos, de los cuales 31 estuvieron presentes en el aceite obtenido con destilador Rayleigh. Cuatro de los compuestos encontrados solo en el extracto Clevenger, rotulados con número romano en la Figura 3 y en el Cuadro 2, se obtuvieron en los dos tiempos de extracción (60 y 120 min); sin embargo, su identidad no se determinó y se trató de compuestos presentes en baja proporción. Los otros dos compuestos también se obtuvieron solo con el destilador Clevenger con tiempo de extracción de 120 min. Uno de ellos se rotuló con la letra *a* y se identificó como  $\gamma$ -elemeno. El otro, rotulado con la letra *b*, no se identificó con precisión y se catalogó como un sesquiterpeno oxigenado. Así, en cuanto a número de compuestos, el perfil fitoquímico del aceite esencial con destilador Rayleigh, operado durante 60 min, fue 88.6 % similar que el obtenido con destilador Clevenger, el cual constituye el sistema de referencia, y 83.8 % similar con un tiempo de operación de 120 min. Por otro lado, la similitud fue de 96.2 % para un tiempo de extracción de 60 min, en virtud de que los compuestos rotulados con número romano tuvieron concentración baja, pero se redujo a 87.2 % con un tiempo de 120 min, lo cual se debió a que el compuesto rotulado con la letra *b* e identificado como un sesquiterpeno oxigenado, tuvo participación de 10.25 % en el aceite. En este sentido, si el equipo Rayleigh constituye una modalidad susceptible de uso en zonas de desarrollo de *S. molle*, debido al potencial de extracción de cantidades mayores de aceite esencial, será necesario atender tres aspectos: primero, verificar la identidad de los compuestos que solo se obtuvieron con destilador Clevenger; segundo, evaluar la actividad biológica de esos compuestos para determinar la importancia de su presencia en el aceite extraído; y, tercero, mejorar la operación del destilador Rayleigh para incrementar la similitud con respecto al aceite obtenido con destilador Clevenger.

Con respecto a los compuestos encontrados en los aceites extraídos con ambos equipos, 16 fueron



**Table 2. Relative composition (%) of the essential oil of *Schinus molle* leaves using two distillation systems and different extraction times. Cuadro 2. Composición relativa (%) del aceite esencial de hojas de *Schinus molle* obtenido con dos equipos de destilación y distintos tiempos de extracción.**

Number/ Número	Compound/ Componente	Formule/ Fórmula	RI cal	20 min <sup>®</sup>	40 min <sup>®</sup>	60 min <sup>®</sup>	60 min <sup>®</sup>	80 min <sup>®</sup>	100 min <sup>®</sup>	120 min <sup>®</sup>	120 min <sup>®</sup>
1	Tricyclene/ Triciclano	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	923	1.327 (0.356)	0.880 (0.318)	1.103 (0.252)	0 (0)	1.230 (0.309)	1.287 (0.415)	1.153 (0.352)	0.170 (0.057)
2	α-pinene/ α-pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	934	7.287 (0.815)	6.120 (0.622)	6.713 (0.552)	3.593 (0.528)	6.940 (0.239)	7.357 (0.615)	7.210 (0.516)	2.723 (0.393)
3	Camphene/ Canfeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	951	7.097 (1.649)	5.250 (1.657)	6.393 (1.149)	2.030 (0.573)	7.250 (1.632)	7.447 (2.096)	7.130 (1.735)	1.327 (0.453)
4	Sabinene/ Sabineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	974	1.453 (0.124)	1.263 (0.092)	1.400 (0.050)	0.663 (0.087)	1.410 (0.072)	1.147 (0.240)	1.050 (0.078)	0.290 (0.127)
5	β-pinene/ β-pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	979	2.693 (0.622)	1.990 (0.554)	2.390 (0.369)	0.843 (0.201)	2.657 (0.584)	2.810 (0.725)	2.710 (0.565)	0.460 (0.211)
6	β-myrcene/ β-mirceno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	990	3.897 (0.454)	5.320 (1.066)	4.147 (0.620)	3.133 (0.488)	3.767 (0.627)	3.707 (0.132)	3.580 (0.555)	2.393 (0.315)
7	α-phellandrene/ α-felandreno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1008	25.030 (1.898)	22.903 (1.292)	22.50 (0.239)	31.293 (2.468)	24.94 (0.408)	22.827 (0.815)	24.283 (1.744)	27.320 (2.301)
8	o-cymene/ o-cimeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1026	1.593 (0.139)	1.773 (0.112)	1.753 (0.127)	1.587 (0.223)	1.613 (0.256)	1.447 (0.069)	1.557 (0.158)	1.303 (0.218)
9	Limonene + β-felandrene/ Limoneno + β-felandreno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1030	23.377 (1.523)	23.037 (0.990)	23.423 (0.311)	6.987 (0.521)	24.493 (1.196)	23.690 (0.616)	23.087 (2.541)	8.583 (0.697)
10	γ-terpinene/ γ-terpineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1060	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.463 (0.153)	0 (0)
11	α-terpinolene/ α-terpinoleno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1087	0 (0)	0.273 (0.007)	0.300 (0.015)	0 (0)	0.283 (0.019)	0.303 (0.015)	0 (0)	0 (0)
12	Anethole/ Anetol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	1300	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.850 (0.312)	5.520 (3.475)	0 (0)
13	Sesquiterpene (Ni)/ Sesquiterpeno (Ni)	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1390	0.310 (0.038)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.823 (0.672)	5.573 (1.156)	0 (0)
a	γ-elemene/ γ-elemeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1436	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.733 (0.095)
14	γ-murolene/ γ-muroleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1480	0.780 (0.460)	0.353 (0.029)	0.380 (0.012)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
15	δ-guaiene/ δ-guaiteno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1493	1.380 (0.102)	1.587 (0.168)	1.407 (0.139)	1.593 (0.417)	1.443 (0.060)	1.183 (0.156)	0.953 (0.078)	1.567 (0.113)
16	Viridiflorene/ Viridifloreño	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1514	2.487 (0.655)	1.833 (0.091)	1.773 (0.154)	1.467 (0.079)	1.723 (0.134)	1.427 (0.231)	1.107 (0.115)	1.210 (0.103)

Values in parentheses correspond to standard error of the mean (n = 3). RI cal: calculated retention index. Sesquiterpene O: oxygenated sesquiterpene. Uc: unidentified compound. © Cleveenger apparatus. © Rayleigh distiller  
Los valores entre paréntesis corresponden a error estándar de la media (n = 3). RI cal: índice de retención calculado. Sesquiterpeno O: Sesquiterpeno oxigenado. Ni: compuesto no identificado. © Aparato Cleveenger.  
© Destilador Rayleigh

**Table 2. Relative composition (%) of the essential oil of *Schinus molle* leaves using two distillation systems and different extraction times. (cont.)**  
**Cuadro 2. Composición relativa (%) del aceite esencial de hojas de *Schinus molle* obtenido con dos equipos de destilación y distintos tiempos de extracción. (cont.)**

Number/ Número	Compound/ Componente	Formule/ Fórmula	RI cal	20 min®	40 min®	60 min®	60 min®	80 min®	100 min®	120 min®	120 min®
17	Sesquiterpene (Ni)/ Sesquiterpeno (Ni)	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1529	1.943 (0.197)	2.063 (0.105)	1.987 (0.117)	2.483 (0.269)	2.100 (0.086)	1.740 (0.227)	1.573 (0.075)	2.563 (0.185)
18	Germacrene B/ Germacreno B	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1569	0.803 (0.049)	0.890 (0.055)	0.840 (0.067)	2.397 (1.303)	0.840 (0.025)	0.690 (0.104)	0.557 (0.041)	0.917 (0.061)
19	Sesquiterpene(Ni)/ Sesquiterpeno (Ni)	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1573	0.520 (0.025)	0.560 (0.023)	0.547 (0.030)	0 (0)	0.530 (0.035)	0.517 (0.079)	0.443 (0.047)	0.530 (0.053)
20	Sesquiterpene O (Ni)/ Sesquiterpeno O (Ni)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	1591	4.903 (0.513)	4.867 (0.927)	4.557 (0.686)	2.233 (1.275)	3.473 (0.919)	2.553 (0.154)	0 (0)	2.350 (0.131)
21	Sesquiterpene O (Ni)/ Sesquiterpeno O (Ni)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	1600	0 (0)	3.173 (0.802)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
22	Sesquiterpene O (Ni)/ Sesquiterpeno O (Ni)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	1655	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3.593 (0.859)	0 (0)	0 (0)
23	Sesquiterpene O (Ni)/ Sesquiterpeno O (Ni)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	1664	0 (0)	0 (0)	3.400 (0.647)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
b	Sesquiterpene O (Ni)/ Sesquiterpeno O (Ni)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	1672	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10.250 (1.073)
24	Sesquiterpene O (Ni)/ Sesquiterpeno O (Ni)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	1719	0 (0)	0.573 (0.043)	0.650 (0.097)	0 (0)	0.693 (0.009)	0.747 (0.107)	0 (0)	0.797 (0.081)
25	Sesquiterpene O (Ni)/ Sesquiterpeno O (Ni)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	1724	3.430 (0.248)	4.02 (0.149)	4.027 (0.137)	8.097 (0.613)	4.177 (0.118)	4.203 (0.373)	3.663 (0.511)	8.343 (0.462)
I	Uc/Ni		1734	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.853 (0.078)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.300 (0.070)
26	Uc/Ni		1760	2.550 (0.484)	3.737 (0.179)	3.183 (0.213)	10.723 (0.621)	3.387 (0.659)	2.280 (0.467)	3.017 (0.645)	4.487 (0.417)
II	Uc/Ni		1786	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.437 (0.047)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.377 (0.019)
27	Uc/Ni		1791	1.897 (0.172)	2.417 (0.382)	2.060 (0.338)	4.417 (0.247)	2.097 (0.041)	1.733 (0.181)	1.507 (0.122)	2.953 (0.181)
28	Uc/Ni		1909	0 (0)	0.337 (0.032)	0.313 (0.028)	1.077 (0.193)	0.3 (0)	0 (0)	0 (0)	1.013 (0.099)
III	Uc/Ni		1921	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.583 (0.050)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.443 (0.047)
IV	Uc/Ni		1950	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.960 (1.041)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.717 (0.090)
29	Uc/Ni		1960	0.920 (0.253)	0.963 (0.054)	1.003 (0.050)	0 (0)	0.957 (0.103)	1.107 (0.159)	0.930 (0.155)	5.250 (0.462)
30	Uc/Ni		1974	1.270 (0.321)	1.313 (0.089)	1.357 (0.087)	6.543 (0.792)	1.270 (0.136)	1.437 (0.207)	1.407 (0.130)	7.230 (0.650)
31	Uc/Ni		2016	3.057 (0.714)	2.513 (0.284)	2.39 (0.336)	5.003 (0.270)	2.423 (0.078)	2.087 (0.365)	1.517 (0.123)	3.407 (0.405)

Values in parentheses correspond to standard error of the mean (n = 3). RI cal: calculated retention index. Sesquiterpene O: oxygenated sesquiterpene. Uc: unidentified compound. © Clevenger apparatus. © Rayleigh distiller  
 Los valores entre paréntesis corresponden a error estándar de la media (n = 3). RI cal: índice de retención calculado. Sesquiterpene O: Sesquiterpeno oxigenado. Ni: compuesto no identificado. © Aparato Clevenger.  
 © Destilador Rayleigh

**Table 3. Relative concentration (%) of terpenic groups detected in *Schinus molle* leaf essential oil, using two distillation equipment and different extraction times.****Cuadro 3. Concentración relativa (%) de los grupos terpénicos detectados en el aceite esencial de hoja de *Schinus molle*, obtenido con dos equipos de destilación y distintos tiempos de extracción.**

Compounds/ Compuestos	20 min <sup>®</sup>	40 min <sup>®</sup>	60 min <sup>®</sup>	60 min <sup>®</sup>	80 min <sup>®</sup>	100 min <sup>®</sup>	120 min <sup>®</sup>	120 min <sup>®</sup>
Monoterpenes/ Monoterpenos	73.753 (2.720)	68.803 (1.330)	70.120 (1.040)	50.140 (4.249)	74.580 (0.305)	72.017 (3.150)	72.230 (2.477)	74.567 (4.319)
Oxygenated monoterpenes / Monoterpenos oxigenados	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.850 (0.312)	5.520 (3.475)	7.650 (0.693)
Sesquiterpenes/ Sesquiterpenos	8.223 (1.396)	7.290 (0.411)	6.937 (0.500)	7.937 (1.077)	6.633 (0.249)	7.387 (0.861)	10.207 (1.127)	0 (0)
Oxygenated sesquiterpenes / Sesquiterpenos oxigenados	8.333 (0.740)	12.63 (0.207)	12.630 (0.576)	10.330 (1.610)	8.343 (0.851)	11.100 (1.408)	3.663 (0.511)	21.740 (1.667)
Other/ Otros	9.687 (0.772)	11.277 (0.782)	10.307 (0.803)	19.880 (2.697)	10.440 (0.716)	8.643 (1.220)	8.380 (0.779)	26.177 (2.287)

Values in parentheses correspond to standard error of the mean (n = 3). ©Clevenger apparatus. <sup>®</sup>Rayleigh distiller.

Los valores entre paréntesis corresponden a error estándar de la media (n = 3). ©Aparato Clevenger. <sup>®</sup>Destilador Rayleigh.

identified monoterpenes as the main group present, followed by sesquiterpenes, in *S. molle* essential oil from leaves collected in Naviraí, Brazil. However, Phiri et al. (2021) found that the sesquiterpenes group was in higher proportion than monoterpenes in *S. molle* leaves collected in Palapye, Botswana, confirming that the composition may vary between regions

The operation of the Rayleigh distiller was evaluated in ranges from 20 to 120 min. This factor did not affect the relative presence of terpenic compounds, although the statistical analysis showed a significant interaction between the variation factors, given by extraction time and type of compound (Table 3). The reason for this is that monoterpenes and sesquiterpenes showed no change in their relative presence depending on the extraction time, but oxygenated monoterpenes and oxygenated sesquiterpenes did. Oxygenated monoterpenes were only identified in extracts with 100 and 120 min of processing. In the case of the oxygenated sesquiterpenes, there were differences between extraction times, but no clear trend was actually observed, although the content in the samples with 120 min of processing was noticeably lower. On the other hand, the relative presence of unidentified compounds showed no variation depending on the extraction time.

Although the monoterpenes group was the most present in all extraction times, the identification of the second and third groups had a very variable behavior. The samples corresponding to extraction times between

plenamente identificados. Del resto, aunque nueve no se identificaron con precisión, fueron catalogados dentro del grupo de los sesquiterpenos (tres) y sesquiterpenos oxigenados (seis) con base en su peso molecular. En general, se identificaron cinco grupos de compuestos terpénicos: monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados y otros compuestos; el Cuadro 3 indica su composición relativa en las condiciones de extracción evaluadas. Acorde con el Cuadro 4, el análisis estadístico mostró diferencias en la participación relativa general de cada grupo. Entre los compuestos identificados, el grupo de mayor presencia fue el de los monoterpenos (66.16-78.40 %), seguido por los sesquiterpenos oxigenados, luego por los sesquiterpenos y, finalmente, por los monoterpenos oxigenados en pequeña concentración. De forma similar, Volpini-Klein et al. (2021) identificaron monoterpenos como el principal grupo presente, seguido de sesquiterpenos, en aceite esencial de *S. molle* a partir de hojas colectadas en Naviraí, Brasil. No obstante, Phiri et al. (2021) encontraron que el grupo de sesquiterpenos estaba en mayor proporción que los monoterpenos en hojas de *S. molle* colectadas en Palapye, Botswana, lo cual confirma que la composición puede variar entre regiones.

La operación del destilador Rayleigh se evaluó en rangos de 20 a 120 min. Este factor no afectó la presencia relativa de compuestos terpénicos, aunque el análisis estadístico mostró que hubo interacción significativa entre los factores de variación, dados por el tiempo de extracción y el tipo de compuesto

**Table 4. Mean terpenic composition of *Schinus molle* essential oil obtained in Rayleigh distiller.****Cuadro 4. Concentración media de compuestos terpénicos en aceite esencial de *Schinus molle*, obtenido con el destilador Rayleigh.**

Compounds / Compuestos	Concentration (%) / Concentración (%)
Monoterpenes / Monoterpenos	71.92 a
Oxygenated monoterpenes / Monoterpenos oxigenados	1.06 d
Sesquiterpenes / Sesquiterpenos	7.78 c
Sesquiterpenes oxygenated / Sesquiterpenos oxigenados	9.45 bc
OT	9.79 b
HSD / DSH	1.89
CV (%)	9.99

Different letters associated with the means indicate significant difference between concentrations according to Tukey's honest significant difference (HSD) ( $P = 0.05$ ). CV: coefficient of variation. OT: other unidentified compounds.

Letras distintas asociadas a las medias indican diferencia significativa entre concentraciones de acuerdo con diferencia significativa honesta (DSH) de Tukey ( $P = 0.05$ ). CV: coeficiente de variación. OT: otros compuestos no identificados.

20 and 100 min had the oxygenated sesquiterpenes as the second most important group (6.81-13.85 %) and the hydrocarbonated sesquiterpenes as the third (5.6-10.86 %). However, in the 120 min extraction routine, the order of presence was reversed; the group with the highest presence was the hydrocarbonated sesquiterpenes (8.76-12.43 %) and the third group was the oxygenated sesquiterpenes (2.67-4.37 %). The significant presence of the oxygenated monoterpenes group was detected after 100 min of extraction, with anethole being the only identified compound of this type. The compounds with the highest presence were  $\alpha$ -phellandrene (21.20-28.57 %), limonene +  $\beta$ -phellandrene (19.07-27.78 %), camphene (3.32-9.93 %),  $\alpha$ -pinene (5.74-8.56 %),  $\beta$ -myrcene (2.95-6.91 %) and  $\beta$ -pinene (1.31-3.55 %) which together accounted for 62.09 to 73.36 % of the total essential oil, all belonging to the group of hydrocarbon monoterpenes.

The presence of compound b, obtained after 120 min of extraction, stands out in the case of the essential oil extracted with a Clevenger distiller. This was catalogued as an oxygenated sesquiterpene; however, although it had a participation of 10.25 %, the confirmation of its identity requires more research work. The results partially agreed with available information from the Mograne region (northeastern Tunisia), where the main components of *S. molle* leaf essential oil were  $\alpha$ -phellandrene, limonene +  $\beta$ -phellandrene, myrcene, and  $\alpha$ -pinene (Zahed et al., 2010). Also, Phiri et al. (2021) found limonene, elemol,  $\alpha$ -phellandrene and aromadendrene as the main compounds in leaves collected in Palapye, Botswana. On the other hand, Ennigrou et al. (2011) reported  $\alpha$ -phellandrene,  $\beta$ -phellandrene and  $\alpha$ -pinene as major compounds in the essential oil of *S. molle* leaves collected in El Ghazala, northern Tunisia. In Algeria, *S. molle* essential oil presented  $\alpha$ -phellandrene,  $\beta$ -phellandrene, elemol and

(Cuadro 3). La razón de esto es que los monoterpenos y sesquiterpenos no modificaron su presencia relativa en función del tiempo de extracción, pero sí lo hicieron los monoterpenos oxigenados y los sesquiterpenos oxigenados. Los monoterpenos oxigenados solo se identificaron en los extractos con 100 y 120 min de proceso. En el caso de los sesquiterpenos oxigenados hubo diferencias entre los tiempos de extracción, pero en realidad no se observó una tendencia clara, aunque el contenido en las muestras con 120 min de proceso fue notoriamente menor. Por otro lado, la presencia relativa de compuestos no identificados no varió en función del tiempo de extracción.

Si bien el grupo de los monoterpenos fue el de mayor presencia en todos los tiempos de extracción, la identificación del segundo y tercer grupo tuvo un comportamiento muy variable. Las muestras correspondientes a tiempos de extracción entre 20 y 100 min tuvieron como segundo grupo más importante al de los sesquiterpenos oxigenados (6.81-13.85 %) y como tercer grupo al de los sesquiterpenos hidrocarbonados (5.6-10.86 %). En contraste, en la rutina de extracción de 120 min, el orden de presencia se invirtió; el grupo con mayor presencia fue el de los sesquiterpenos hidrocarbonados (8.76-12.43 %) y el tercero pasó a ser del grupo de los sesquiterpenos oxigenados (2.67-4.37 %). La presencia significativa del grupo de los monoterpenos oxigenados se detectó a partir de 100 min de extracción, siendo el anetol el único compuesto identificado de este tipo. Los compuestos con mayor presencia fueron  $\alpha$ -phellandrene (21.20-28.57 %), limoneno +  $\beta$ -phellandrene (19.07-27.78 %), canfeno (3.32-9.93 %),  $\alpha$ -pineno (5.74-8.56 %),  $\beta$ -myrceno (2.95-6.91 %) y  $\beta$ -pineno (1.31-3.55 %) que en conjunto representaron de 62.09 al 73.36 % del total del aceite esencial, todos ellos pertenecientes al grupo de los monoterpenos hidrocarbonados.

limonene (Belhamel et al., 2009). In the region of Évora, southeastern Portugal, Martins et al. (2014) reported  $\alpha$ -phellandrene, limonene,  $\beta$ -phellandrene,  $\beta$ -myrcene and  $\alpha$ -pinene as main compounds in *S. molle* essential oil. Other studies point to more notable qualitative differences; Abdel-Sattar et al. (2010) reported *p*-cymene,  $\alpha$ -terpinene and  $\beta$ -pinene as the main volatile compounds in *S. molle* leaf essential oil and, in Porto Alegre, Brazil, Pawlowski et al. (2012) reported that two *S. molle* varieties had  $\alpha$ -pinene as the major compound and also found limonene and  $\beta$ -pinene. In Tacaes, Costa Rica, Díaz et al. (2008) identified  $\beta$ -pinene and  $\alpha$ -pinene as majority compounds.

Therefore, in the present study, the main components of the essential oil of *S. molle* leaves collected in the central region of Mexico were similar to the phytochemical profiles reported in Tunisia and Portugal. The compound  $\gamma$ -terpinene was detected up to 120 min of extraction;  $\alpha$ -terpinolene (0.25-0.32 %), in the range of 40 to 100 min; and  $\gamma$ -muurolene (0.28-1.70 %) only in the range of 20 to 60 min. The group with the greatest variation was oxygenated sesquiterpenes, where unidentified compounds (compounds 21, 22, 23; Figure 2) were only detected at one extraction time, suggesting that this factor had no influence for these compounds and such inconsistency requires further experimental evaluation for clarification. Unidentified compounds accounted for 8.38 to 11.28 % of the total oil.

Ennigrou et al. (2011) mentioned that the chemical composition of *S. molle* leaf essential oil varies considerably depending on the genetic origin, crop origin, season, plant part analyzed, and extraction methods. In a similar way, Volpini-Klein et al. (2021) showed that the composition depends on the time of collection of the plant material, but also on the method and time of extraction. On the other hand, it has been suggested that the differences in essential oil composition patterns are probably due to the generation of several metabolic pathways in the secondary metabolism of *S. molle* (Zahed et al., 2010).

Moreover, the number of compounds from the group of oxygenated sesquiterpenes decreased for the extraction time of 120 min, because of the six possible compounds detected, only the one identified with the number 25 was recorded (Figure 2). Lucchesi et al. (2004) mentioned losses of volatile compounds and degradation of unsaturated or ester compounds due to thermal or hydrolytic effects at the time of extraction of essential oils using methods such as hydrodistillation, steam distillation and Soxhlet extraction. These authors also pointed out that the reduction in extraction time means that some compounds are not extracted, but that degradation by hydrolysis, transesterification or oxidation is minimized and, therefore, fewer degradation products are observed in the profile. In the

En el caso del aceite esencial extraído con destilador Clevenger, resalta la presencia del compuesto b obtenido con 120 min de extracción. Este se catalogó como un sesquiterpeno oxigenado; sin embargo, aunque tuvo participación de 10.25 %, la confirmación de su identidad requiere más trabajo de investigación. Los resultados coincidieron parcialmente con información disponible de la región de Mograne (noreste de Túnez), donde los componentes principales del aceite esencial de hojas de *S. molle* fueron  $\alpha$ -felandreno, limoneno +  $\beta$ -felandreno, mirceno y  $\alpha$ -pineno (Zahed et al., 2010). Asimismo, Phiri et al. (2021) encontraron limoneno, elemol,  $\alpha$ -felandreno y aromadendreno como los principales compuestos en hojas colectadas en Palapye, Botswana. Por otro lado, Ennigrou et al. (2011) reportaron  $\alpha$ -felandreno,  $\beta$ -felandreno y  $\alpha$ -pineno como compuestos mayoritarios en el aceite esencial de hojas de *S. molle* colectadas en El Ghazala, al norte de Túnez. En Argelia, el aceite esencial de *S. molle* presentó  $\alpha$ -felandreno,  $\beta$ -felandreno, elemol y limoneno (Belhamel et al., 2009). En la región de Évora, en el sureste de Portugal, Martins et al. (2014) reportaron  $\alpha$ -felandreno, limoneno,  $\beta$ -felandreno,  $\beta$ -mirceno y  $\alpha$ -pineno como principales compuestos en el aceite esencial de *S. molle*. Otros estudios señalan diferencias cualitativas más notables; Abdel-Sattar et al. (2010) reportaron *p*-cimeno,  $\alpha$ -terpineno y  $\beta$ -pineno como los principales compuestos volátiles en el aceite esencial de hojas de *S. molle* y, en Porto Alegre, Brasil, Pawlowski et al. (2012) informaron que dos variedades de *S. molle* tuvieron como compuesto mayoritario a  $\alpha$ -pineno y también encontraron limoneno y  $\beta$ -pineno. En Tacaes, Costa Rica, Díaz et al. (2008) identificaron  $\beta$ -pineno y  $\alpha$ -pineno como compuestos mayoritarios.

Con base en lo anterior, en el presente estudio, los componentes principales del aceite esencial de hojas de *S. molle*, colectadas en la región central de México, fueron similares a los perfiles fitoquímicos reportados en Túnez y Portugal. El compuesto  $\gamma$ -terpineno se detectó hasta los 120 min de extracción;  $\alpha$ -terpinoleno (0.25-0.32 %), en el rango de 40 a 100 min; y  $\gamma$ -muuroleno (0.28-1.70 %) solo en el rango de 20 a 60 min. El grupo con mayor variación fue el de los sesquiterpenos oxigenados, en los cuales hubo compuestos no identificados (compuestos 21, 22, 23; Figura 2) que únicamente se detectaron en un tiempo de extracción, lo que sugiere que este factor no tuvo influencia para esos compuestos y dicha inconsistencia requiere de mayor evaluación experimental para su clarificación. Los compuestos no identificados representaron 8.38 a 11.28 % del total del aceite.

Ennigrou et al. (2011) mencionaron que la composición química del aceite esencial de hojas de *S. molle* varía considerablemente dependiendo del origen genético, el origen del cultivo, la temporada, la parte de la planta analizada y los métodos de extracción. En forma similar, Volpini-Klein et al. (2021) mostraron

present study, the presence of anethole was detected only in the longer extraction times of 100 and 120 min. In this regard, the 120 min times were the first to be used for extraction, so that contamination with the components of another residual essential oil in the distillation column cannot be ruled out. On the other hand, although the use of Rayleigh distillation allows obtaining an essential oil very similar to that obtained with the Clevenger apparatus, it will be necessary to complete the identification of the compounds missing in the larger scale operation to assess the impact on the biological activity of the product obtained.

## Conclusions

The essential oil of *Schinus molle* extracted with a Rayleigh-type batch distillation column was characterized and compared with essential oil collected with a Clevenger distiller. The operating time of the equipment affected the composition of the essential oil. The scaling up of the process carried out through the Rayleigh distiller allowed obtaining a greater amount of oil, but with lower yield and lower number of compounds. The similarity of the phytochemical profile between the extracts of both equipment varied between 87.2 and 96.2 % depending on the operation time. The group with the highest presence in the essential oil was hydrocarbon monoterpenes. The compounds with the highest presence were  $\alpha$ -phellandrene and limonene +  $\beta$ -phellandrene.

### End of English version

## References / Referencias

- Abdel-Sattar, E., Zaitoun, A. A., Farag, M. A., El Gayed, S. H., & Harraz, F. M. H. (2010). Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of *Schinus molle* L. leaf and fruit essential oils against *Trogoderma granarium* and *Tribolium castaneum*. *Natural Product Research*, 24(3), 226–235. <https://doi.org/10.1080/14786410802346223>
- Adamski, A., & Adamska, J. (2021). The use of essential oils - alpha and beta-pinene in the treatment of Covid-19. *Annals of Clinical and Medical Case Reports*, 7(9), 1–4. <https://doi.org/10.47829/ACMCR.2021.7903>
- Awadh, A. N. A., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., & Al-Othman, A. H. M. R. (2011). Comparative analysis of the oil and supercritical CO<sub>2</sub> extract of *Schinus molle* L. growing in Yemen. *Natural Product Research*, 25(14), 1366–1369. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.513978>
- Belhamel, K., Abderrahim, A., & Ludwi, R. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Schinus molle* L. growth in Algeria. *Acta Horticulturae*, 826, 201–204. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.826.27>

que la composición depende de la época de colecta del material vegetal, pero también del método y tiempo de extracción. Por otra parte, se ha sugerido que las diferencias en los patrones de composición del aceite esencial se deben probablemente a la generación de varias rutas metabólicas en el metabolismo secundario de *S. molle* (Zahed et al., 2010).

Por otro lado, el número de compuestos del grupo de sesquiterpenos oxigenados disminuyó para el tiempo de extracción de 120 min, ya que de los seis posibles compuestos detectados solo se registró el identificado con el número 25 (Figura 2). Al respecto, Lucchesi et al. (2004) mencionaron que hay pérdidas de compuestos volátiles y degradación de compuestos insaturados o éster, producto de efectos térmicos o hidrolíticos al momento de la extracción de aceites esenciales usando métodos como hidrodestilación, destilación por arrastre de vapor y extracción Soxhlet. Dichos autores también señalaron que la reducción en el tiempo de extracción no implica que algunos compuestos no se logren extraer, sino que se minimiza la degradación por hidrólisis, transesterificación u oxidación y, por tanto, se aprecian menos productos de degradación en el perfil. En el presente trabajo se detectó presencia de anetol solo en los tiempos más prolongados de extracción de 100 y 120 min. Al respecto, los tiempos de 120 min fueron los primeros en usarse para la extracción, por lo cual no puede descartarse una contaminación con los componentes de otro aceite esencial residual en la columna de destilación. Por otra parte, si bien el uso de destilación Rayleigh permite la obtención de un aceite esencial muy similar al obtenido con el aparato Clevenger, será necesario completar la identificación de los compuestos no presentes en la operación de mayor escala, para valorar el impacto sobre la actividad biológica del producto obtenido.

## Conclusiones

El aceite esencial de *Schinus molle* extraído mediante una columna de destilación discontinua tipo Rayleigh se caracterizó y comparó con aceite esencial obtenido con destilador Clevenger. El tiempo de operación de los equipos afectó la composición del aceite esencial. El escalamiento del proceso realizado a través del destilador Rayleigh permitió la obtención de mayor cantidad de aceite, pero con menor rendimiento y menor cantidad de compuestos. La similitud del perfil fitoquímico entre los extractos de ambos equipos varió entre 87.2 y 96.2 % en función del tiempo de operación. El grupo con mayor presencia en el aceite esencial fue el de los monoterpenos hidrocarbonados. Los compuestos de mayor presencia fueron  $\alpha$ -felandreno y limoneno +  $\beta$ -felandreno.

### Fin de la versión en español

- Carpio-Orantes, L. (2016). Arbovirus emergentes en México: chikunguña y zika. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54(3), 278–279. <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2016/im163b.pdf>
- Chávez-Magdaleno, M. E., Luque-Alcaraz, A. G., Gutiérrez-Martínez, P., Cortez-Rocha, M. O., Burgos-Hernández, A., Lizardi-Mendoza, J., & Plascencia-Jatomea, M. (2018). Effect of chitosan-pepper tree (*Schinus molle*) essential oil biocomposites on the growth kinetics, viability and membrane integrity of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(1), 29–45. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/Chavez>
- Combrinck, S., Regnier, T., & Kamatou, G. P. P. (2011). In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.11.011>
- da Camara, C. A. G., Akhtar, Y., Isman, M. B., Seffrin, R. C., & Born, F. S. (2015). Repellent activity of essential oils from two species of citrus against *Tetranychus urticae* in the laboratory and greenhouse. *Crop Protection*, 74, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.04.014>
- da Silva, K. R., Baia, F. P. L., Byler, K. G., & Setzer, W. N. (2020). Essential oils as antiviral agents, potential of essential oils to treat SARS-CoV-2 infection: an In-Silico investigation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3426. <https://doi.org/10.3390/ijms21103426>
- Díaz, C., Quesada, S., Brenes, O., Aguilar, G., & Ciccío, J. F. (2008). Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines. *Natural Product Research*, 22(17), 1521–1534. <https://doi.org/10.1080/14786410701848154>
- Dool, H. V. D., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463–471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
- dos Santos, A. C. A., Rossato, M., Agostini, F., Serafini, L. A., dos Santos, P. L., Molon, R., Dellacassa, E., & Moyna, P. (2009). Chemical composition of the essential oils from leaves and fruits of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi from Southern Brazil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 12(1), 16–25. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643686>
- Ennigrou, A., Hosni, K., Casabianca, H., Vulliet, E., & Smiti, S. (2011). Leaf volatile oil constituents of *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* from Tunisia. Conference Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT 2011, Jelgava, Latvia <https://llufb.llu.lv/conference/foodbalt/2011/FOODBALT-Proceedings-2011-90-92.pdf>
- Flores-Villegas, M. Y., González-Laredo, R. F., Prieto-Ruíz, J. Á., Pompa-García, M., Ordaz-Díaz, L. A., & Domínguez-Calleros, P. A. (2019). Efficiency of the vegetal extract of *Datura stramonium* L. as insecticide for the control of the sawfly. *Madera Bosques*, 25(1), 1–11. <https://doi.org/10.21829/myb.2019.2511642>
- Franz, C., & Novak, J. (2016). Sources of essential oils. In H. K. Can Başer & R. G. Buchbauer (Eds.), *Handbook of essential oils, science, technology, and applications* (2<sup>nd</sup> ed., pp. 43–86). CRC Press.
- Gomes, V., Agostini, G., Agostini, F., Atti, dos S. A. C., & Rossato, M. (2013). Variation in the essential oils composition in Brazilian populations of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 48, 222–227. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.01.003>
- Guzzo, da S. B., Foglio, M. A., Vieira e Rosa, P. de T., Pereira, T. O., & Frattini, F. A. M. (2019). Optimization of hydrodistillation and in vitro anticancer activity of essential oil from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruits. *Chemical Engineering Communications*, 206(5), 619–629. <https://doi.org/10.1080/00986445.2018.1515074>
- Huerta, A., Chiffelle, I., Puga, K., Azúa, F., & Araya, J. E. (2010). Toxicity and repellence of aqueous and ethanolic extracts from *Schinus molle* on elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola*. *Crop Protection*, 29(10), 1118–1123. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.04.010>
- Islam, J., Zaman, K., Duarah, S., Raju, P. S., & Chattopadhyay, P. (2017). Mosquito repellents: An insight into the chronological perspectives and novel discoveries. *Acta Tropica*, 167(2), 216–230. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.031>
- Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydrodistillation. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 323–327. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.083>
- Martins, M., Arantes, S., Candeias, F., Tinoco, M., & Cruz-Morais, J. (2014). Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 485–492. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.063>
- Pawlowski, Á., Kaltchuk-Santos, E., Zini, C. A., Caramão, E. B., & Soares, G. L. G. (2012). Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. *South African Journal of Botany*, 80, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.03.003>
- Pereira, B. D., Epifanio, N. M. M., Souza, M. A. A., & Chaves, D. S. A. (2019). Seasonality effect on essential oil yield and chemical composition of four accessions of *Schinus molle* L. *Revista Virtual de Química*, 11(5), 1551–1561. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190108>
- Phiri, N., Serame, E. L., & Pheko, T. (2021). Extraction, chemical characterization, and antioxidant analysis data of essential oil from *Schinus molle* medicinal plant cultivated in Botswana. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 9(4), 1–9. [https://www.researchgate.net/publication/358350991\\_Extraction\\_chemical\\_composition\\_and\\_antioxidant\\_activity\\_analysis\\_of\\_essential\\_oil\\_from\\_Schinus\\_molle\\_medicinal\\_plant\\_found\\_in\\_Botswana](https://www.researchgate.net/publication/358350991_Extraction_chemical_composition_and_antioxidant_activity_analysis_of_essential_oil_from_Schinus_molle_medicinal_plant_found_in_Botswana)
- Reyes-Guzmán, R., Borboa-Flores, J., Cinco-Moroyoqui, F. J., Rosas-Burgos, E. C., Osuna-Amarillas, P. S., Wong-Corral, F. J., Ortega-Nieblas, M. M., & León-Lara, J. D. D.

- (2012). Actividad insecticida de aceites esenciales de dos especies de *Eucalyptus* sobre *Rhyzopertha dominica* y su efecto en enzimas digestivas de progenies. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 18(3), 385–394. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2012.02.015>
- Rico, F., Gutiérrez, C., & Díaz, C. (2012). Effect of edible coating of chitosan and essential oils on microbiological quality of minimally processed mango (*Mangifera indica* L.). *Vitae*, 19(Supl. 1), S117–S119. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169823914031>
- SAS Institute Inc. (1999). *SAS/STAT® User's guide, version 8*. Cary, NC: Author.
- Scopel, R., Góes, N. R., Alves, F. M., Cassel, E., & Figueiró, V. R. M. (2013). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Schinus molle* L. with co-solvents: mathematical modeling and antimicrobial applications. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 513–519. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300020>
- Seader, J. D., Henley, E. J., & Roper, D. K. (2011). *Separation process principles: Chemical and biochemical operations*. John Wiley & Sons, Inc. (Third Edit).
- Shankar, S., Prasad, S., Owaiz, M., Yadav, S., Manhas, S., & Yaqoob, M. (2021). Essential oils, components and their applications: a review. *Plant Archives*, 21(1), 2027–2033. <https://doi.org/10.51470/PLANTARCHIVES.2021.v21.S1.331>
- Tabassum, N., & Vidyasagar, G. M. (2013). Antifungal investigations on plant essential oils: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 19–28. [https://www.researchgate.net/publication/283857924\\_Antifungal\\_investigations\\_on\\_plant\\_essential\\_oils\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/283857924_Antifungal_investigations_on_plant_essential_oils_A_review)
- Valle-Ortiz, D. J., Gómez-Cruz, A., Hernández-Fuentes, A. D., & Valle-Guadarrama, S. (2019). Microbial control in white cactus pear with biopolymeric coating of chitosan, candelilla wax and thyme essential oil. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(3), 201–207. <https://dx.doi.org/10.35196/rfm.2019.3.201-207>
- Volpini-Klein, A. F. N., Lima Júnior, S. E., Cardoso, C. A. L., Cabral, M. R. P., Louro, G. M., Coutinho, E. J., de Jesus, D. A., Junior, D. P., & Simionatto, E. (2021). Chemical composition of essential oils from leaves and fruits of *Schinus molle* obtained by different extraction methods (hydrodistillation, fractional hydrodistillation and steam distillation) and seasonal variations. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 24(2), 228–242. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1914739>
- Zahed, N., Hosni, K., Ben Brahim, N., Kallel, M., & Sebei, H. (2010). Allelopathic effect of *Schinus molle* essential oils on wheat germination. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(6), 1221–1227. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0492-z>