

## Relatório no âmbito do projeto

## Report on project

### Valorização de Sobrantes Florestais - Produção, Caraterização e Qualificação do Óleo Essencial de *Cryptomeria japonica* D. Don

Julho, 2019

July, 2019



Ciências  
ULisboa

CQB  
Centro  
de Química  
e Bioquímica

Centro de Biotecnologia Vegetal (CBV), CESAM Lisboa  
Centro de Química e Bioquímica (CQB)

Cofinanciado por



GOVERNO  
DOS AÇORES



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu de  
Desenvolvimento Regional



## Índice / Table of contents

CBV, CESAM Lisboa.....	1
Análise de óleo essencial / Essential oil analysis - <i>Cryptomeria japonica</i> (Thunb. ex L.f.) D.Don .....	1
Análise por Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS) .....	1
Analysis by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS).....	1
 CQB .....	6
Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ ( $^{13}\text{C}$ RMN).....	6
Analysis by $^{13}\text{C}$ Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ( $^{13}\text{C}$ NMR) .....	14



**Análise de óleo essencial / Essential oil analysis - *Cryptomeria japonica* (Thunb. ex L.f.) D.Don**

**Análise por Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)**

**Analysis by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS)**

**Identificação do Produtor / Identification of the Producer**

Produtor / Producer	Azorina S. A.
Responsável para contacto / Contact Name	António J. R. M. Almeida / Maria C. S. M. Rodrigues
Endereço / Address	Av. Antero de Quental 9 C 2ºAndar, 9500-160 Ponta Delgada, Açores, Portugal
Telefone / Phone	296240602
Email	<a href="mailto:Antonio.JR.Almeida@azores.gov.pt">Antonio.JR.Almeida@azores.gov.pt</a> <a href="mailto:Maria.CSM.Rodrigues@azores.gov.pt">Maria.CSM.Rodrigues@azores.gov.pt</a>

**Identificação da planta e momento de colheita / Plant identification and harvest time**

Nome científico / Scientific name:	<i>Cryptomeria japonica</i> (Thunb. ex L.f.) D.Don
Nome vulgar / Common name:	Criptoméria, Cedro-japonês / Japanese red-cedar
Família / Family:	Cupressaceae
Parte da planta / Plant part	<i>vide</i> página seguinte / <i>vide</i> overleaf
Floral ou Vegetativo / Floral or Vegetative	
Mês, ano de colheita / Harvest month, year	<i>vide</i> página seguinte / <i>vide</i> overleaf
Exemplar de herbário / Voucher code	
Código de colheita / Harvest code	

**Identificação do local de cultura ou colheita / Identification of the place of cultivation or harvesting**

Local, país / Place, country	<i>vide</i> página seguinte / <i>vide</i> overleaf
Cultivo, Espontânea / Cultivation, Wild harvest	Matas / Woods
Modo de cultivo / Cultivation method	

**Identificação da amostra / Sample identification**

Amostra / Sample:	Óleo essencial / Essential oil
Método de extração / Extraction procedure	<i>vide</i> página seguinte / <i>vide</i> overleaf
Tempo de extração / Extraction time	<i>vide</i> página seguinte / <i>vide</i> overleaf
Rendimento (% v/p.f. ou v/p.s.) / Yield (% v/f.w. or v/d.w.)	<i>vide</i> página seguinte / <i>vide</i> overleaf
Mês, ano de engarrafamento / Bottling month, year	
Validade / Shelf life	
Código da amostra / Sample code	<i>vide</i> página seguinte / <i>vide</i> overleaf

**Análise do óleo essencial / Essential oil analysis**

Identificação dos compostos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS) e quantificação por Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama (GC-FID), como detalhado em Faria *et al.* (2016).

Volatiles were analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) for component identification, and by Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID), for component quantification, as detailed in Faria *et al.* (2016).

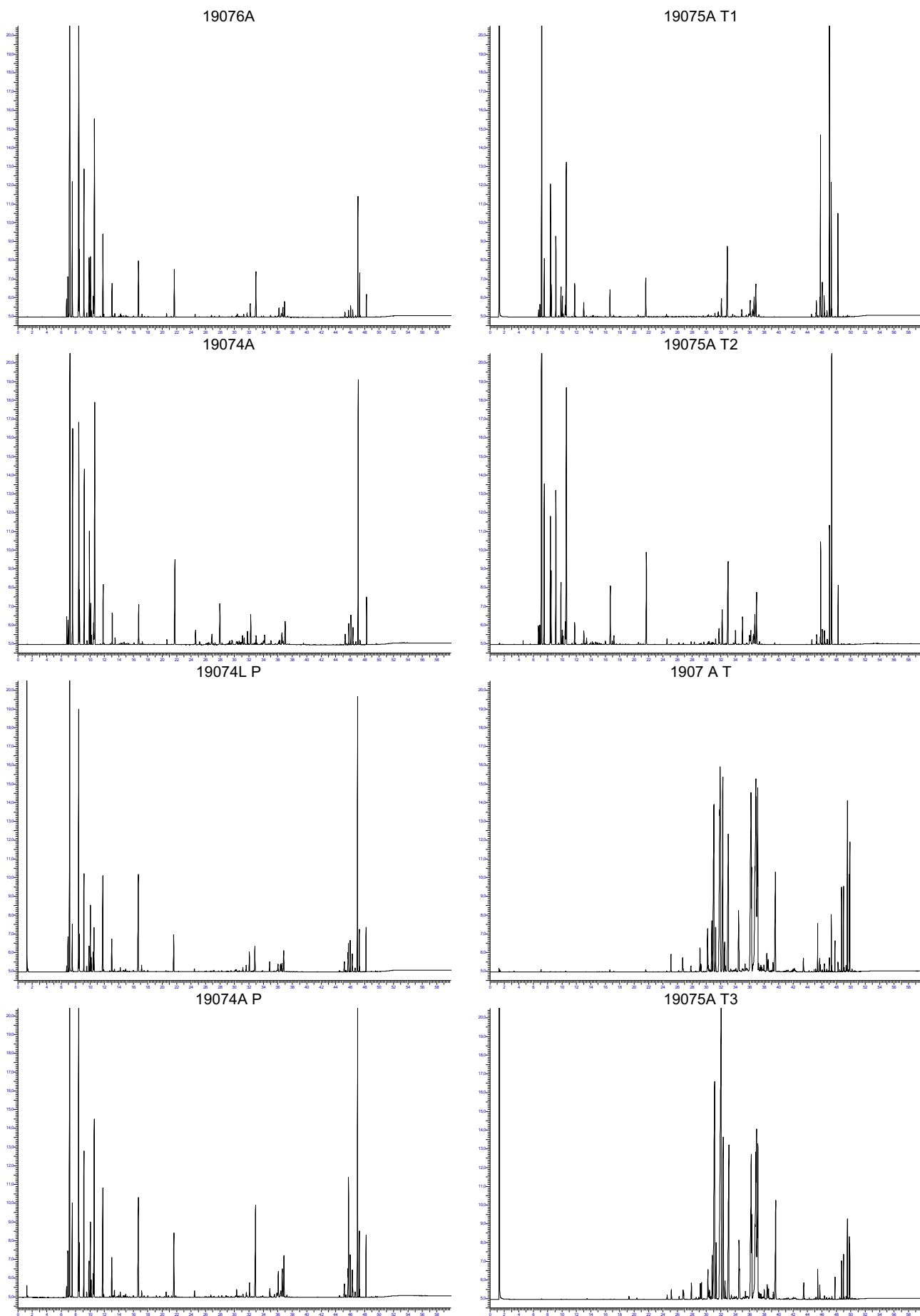
Faria *et al.* (2016) *J. Agric. Food Chem.* 64: 7452–7458

**Tabela 1.** Dados das amostras de óleo essencial de *Cryptomeria japonica* isoladas em julho de 2019.

**Table 1.** Data on *Cryptomeria japonica* essential oils samples, isolated in July 2019.

<i>Cryptomeria japonica</i> (L. fil.) D. Don				Óleo Essencial / Essential Oil					
Tipo de material		Sample type	Origem Provenance	MAC MYC	ME EP	TD DT (h:min)	R Yield (%, v/p)	Código Code	
Ramadas e bicadas com estróbilos ♀	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♀ strobili	Non-woodchips	Achada, Nordeste, S. Miguel, Açores	Jul-19	SD	2:04	0.27	19076A
Ramadas e bicadas com estróbilos ♀	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♀ strobili	Non-woodchips	Caldeira Velha, Ribeira Grande, S. Miguel, Açores	Jul-19	SD	2:01	0.20	19074A
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Praia, São Roque do Pico, Açores	Jul-19	SD	2:00	0.19	19074L P
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Praia, São Roque do Pico, Açores	Jul-19	SD	2:00	0.17	19074A P
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Encosta dos Altares, Praia da Vitória, Terceira, Açores	Jul-19	SD	2:06	0.27	19075A T1
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Encosta dos Altares, Praia da Vitória, Terceira, Açores	Jul-19	HD	1:54	<0.05 (?)	19075A T2
Lenho (madeira de rosa)	Lote estilhado	Wood (pink wood)	Woodchips	Terceira, Açores	Jul-19	HD	5:00	<0.05	1907 A T
Lenho (madeira de árvores com estróbilos ♀)	Lote estilhado	Wood (from trees with ♀ strobili)	Woodchips	Encosta dos Altares, Praia da Vitória, Terceira, Açores	Jul-19	HD	3:30	0.42 (?)	19075A T3

MAC: Mês, ano de colheita. MYC: Month, year of collection. ME: Método de Extração. EP: Extraction Procedure. TD: Tempo de destilação. DT: Distillation time. R: Rendimento. HD: Hydrodistillation. SD: Steam distillation. (?) Valor de rendimento a conferir.



**Fig. 1.** Perfis cromatográficos das amostras analisadas. / **Fig. 1.** Gas chromatography profiles, taken on the DB-1 column, of the essential oils isolated from *Cryptomeria japonica* samples (for sample codes, see Table 1).

**Tabela 2.** Composição percentual das amostras de óleo essencial de *Cryptomeria japonica* isoladas em julho de 2019 (para códigos das amostras vide Tabela 1).

**Table 2.** Percentage composition of the essential oils isolated from *Cryptomeria japonica* samples in July 2019 (for sample codes, vide Table 1).

Componentes	Components	IR / RI	1907_6A	1907_4A	1907_4L_P	1907_4A_P	19075A_T1	1907_5A_T2	1907_A_T	1907_5A_T3
Triciclano	Tricyclene	921	0.5	0.7	0.1	0.3	0.1	0.5		
$\alpha$ -Tujeno	$\alpha$ -Thujene	924	1.3	0.7	1.3	1.3	0.5	0.6		
$\alpha$ -Pineno	$\alpha$ -Pinene	930	29.0	24.3	20.3	19.4	18.0	33.9	t	t
Canfeno	Camphene	938	3.8	5.7	1.8	2.4	2.2	4.4		
Sabineno	Sabinene	958	14.2	6.6	12.6	12.5	5.2	3.8		
$\beta$ -Pineno	$\beta$ -Pinene	963	3.3	1.3	1.3	2.9	1.2	1.8		
$\beta$ -Mirceno	$\beta$ -Myrcene	975	5.3	5.7	4.0	4.4	3.1	4.8		
$\alpha$ -Felandreno	$\alpha$ -Phellandrene	995	0.1	0.1	0.1	0.1	t	t		
$\delta$ -3-Careno	$\delta$ -3-Carene	1000	1.9	4.0	1.0	1.1	1.2	1.8		
$\alpha$ -Terpineno	$\alpha$ -Terpinene	1002	2.0	2.1	2.9	2.3	0.9	0.4		
<i>p</i> -Cimeno	<i>p</i> -Cymene	1003	0.2	0.7	0.6	0.5	t	0.2		
$\beta$ -Felandreno	$\beta$ -Phellandrene	1005	0.8	0.7	0.9	0.7	0.5	0.7		
Limoneno	Limonene	1009	8.5	9.5	1.8	6.2	7.5	10.0	t	t
<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimene	1017	t	t	t	t	t	t		
<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimene	1027	t	t	t	t	t	t		
$\gamma$ -Terpineno	$\gamma$ -Terpinene	1035	3.1	1.8	4.8	3.8	1.5	0.6		
Hidrato de <i>trans</i> -sabineno	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1037	t	t	t	t	t	t		
2,5-Dimetil estireno	2,5-Dimethyl styrene	1059	t	t	t	t	t	t		
Terpinoleno	Terpinolene	1064	1.3	1.0	1.6	1.3	0.7	0.4		
Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1066	t	t	t	t	t	t		
Linalol	Linalool	1074	0.2	0.2	0.1	0.3	t	0.2		
<i>trans</i> -Tujona	<i>trans</i> -Thujone	1081	t	t	t	t	t	t		
Acetato de 1-octen-3-ilo	1-Octen-3-yl acetate	1086	t	t	t	t	t	t		
$\alpha$ -Canfolenal	$\alpha$ -Campholenal	1092	t	t	t	t	t	t		
<i>trans</i> - <i>p</i> -2-Menten-1-ol	<i>trans</i> - <i>p</i> -2-Menthen-1-ol	1099	t	t	t	0.2	t	t		
Cânfora	Camphor	1102	t	t	t	t	t	t		
<i>cis</i> - <i>p</i> -2-Menten-1-ol	<i>cis</i> - <i>p</i> -2-Menthen-1-ol	1114	t	t	t	0.1	t	t		
<i>trans</i> -Pinocanfona (= <i>trans</i> -3-Pinanona)	<i>trans</i> -Pinocamphone (= <i>trans</i> -3-Pinanone)	1121	t	t	t	t	t	t		
Borneol	Borneol	1134	t	t	t	t	t	0.1		
<i>cis</i> -Pinocanfona	<i>cis</i> -Pinocamphone	1134	t	t	t	t	t	0.1		
Terpinen-4-ol	Terpinen-4-ol	1148	2.8	1.6	7.1	3.8	1.7	2.1	t	t
Salicilato de metilo	Methyl salicylate	1159	t	t	t	t	t	0.1		
$\alpha$ -Terpineol	$\alpha$ -Terpineol	1159	0.1	t	0.4	0.2	t	0.3	t	t
<i>cis</i> -Piperitol	<i>cis</i> -Piperitol	1182	t	t	t	t	t	t		
<i>trans</i> -Piperitol	<i>trans</i> -Piperitol	1189	t	t	t	t	t	t		
Acetato de $\alpha$ -fenchilo	$\alpha$ -Fenchyl acetate	1200	t	t	t	t	t	t		
Piperitona	Piperitone	1211	t	t	t	t	t	t		
Geraniol	Geraniol	1236	t	t	t	t	t	t		
Acetato de linalilo	Linalyl acetate	1245	t	0.2	t	0.2	t	t		
<i>trans</i> -Anetole	<i>trans</i> -Anethole	1254	t	t	t	t	t	t		
Acetato de bornilo	Bornyl acetate	1265	2.4	3.9	2.3	2.7	2.6	3.4	t	t
Acetato de <i>cis</i> -verbenilo	<i>cis</i> -Verbenyl acetate	1266	t	t	t	t	t	t		
$\delta$ -Elemeno	$\delta$ -Elemene	1332							t	t
Acetato de $\alpha$ -terpenilo	$\alpha$ -Terpenyl acetate	1334	0.2	0.6	0.1	0.2	0.1	0.2		
$\alpha$ -Cubebeno	$\alpha$ -Cubebene	1345	t	0.1	t	t	t	t	0.5	1.1
Acetato de geraniolo	Geranyl acetate	1370	t	t	t	t	t	t		
$\alpha$ -Copaeno	$\alpha$ -Copaene	1375	t	t	t	t	t	t	t	t
Metil eugenol	Methyl eugenol	1377								
$\beta$ -Bourboneno	$\beta$ -Bourbonene	1379	t	t	t	t	t	t		
$\beta$ -Elemeno	$\beta$ -Elemene	1388	t	t	t	t	t	t	0.5	0.5
$\beta$ -Cariofileno	$\beta$ -Caryophyllene	1414	t	2.2	t	t	t	0.1	t	0.2
$\beta$ -Copaeno	$\beta$ -Copaene	1426	t	t	t	t	t	0.1		
$\alpha$ -Humuleno	$\alpha$ -Humulene	1447	t	t	t	t	t	t	t	0.2
<i>trans</i> - $\beta$ -Farneseno	<i>trans</i> - $\beta$ -Farnesene	1455	t	t	t	t	t	t		
<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-dieno *	<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-diene *	1467	t	t	t	t	t	t	1.4	1.1
$\gamma$ -Muuroloeno	$\gamma$ -Muurolene	1469	0.2	t	t	t	t	t	1.5	1.6
Germacreno D	Germacrene D	1474	0.1	0.4	t	0.3	t	0.1	7.3	11.3
Biciclogermacreno	Bicyclogermacrene	1487	t	t	t	0.1	t	t		
$\alpha$ -Muuroloeno	$\alpha$ -Muurolene	1494	0.2	0.4	0.3	0.1	0.3	0.2	1.2	1.7
$\beta$ -Bisaboleno	$\beta$ -Bisabolene	1500	0.2	0.3	0.3	t	0.3	0.4		
$\gamma$ -Cadineno	$\gamma$ -Cadinene	1500	0.1	0.3	0.2	0.1	0.2	0.3	12.7	21.2
<i>trans</i> -Calameneno	<i>trans</i> -Calamenene	1505	t	t	t	t	t	t	t	t
$\delta$ -Cadineno	$\delta$ -Cadinene	1505	0.8	1.5	1.4	0.6	1.3	1.2	8.0	6.9
Elemol	Elemol	1530	3.6	0.5	1.9	4.6	6.3	4.0	6.3	7.4
<i>trans</i> -Nerolidol	<i>trans</i> -Nerolidol	1549	t	t	t	t	0.1	0.1		
Germacreno D-4-ol *	Germacrene D-4-ol *	1557	t	0.2	t	t	0.5	0.5		

Componentes	Components	IR / RI	1907_6A	1907_4A	1907_4L_P	1907_4A_P	19075A_T1	1907_5A_T2	1907_A_T	1907_5A_T3
Oxido de $\beta$ -cariofileno	$\beta$ -Caryophyllene oxide	1561	t	t	t	t	t	t		
Gleenol *	Gleenol *	1569	t	t	t	t			2.4	1.9
Cedrol	Cedrol	1574	t	t	t	t	t	t		
Anidrooplopanona	Anhydrooplopanone (= $\beta$ -Oplopenone)	1576	0.1	0.2	0.8	0.4	t	1.0		
10- <i>epi</i> - $\gamma$ -Eudesmol	10- <i>epi</i> - $\gamma$ -Eudesmol	1593	t	0.1	t	0.1	0.1	t		
$\gamma$ -Eudesmol	$\gamma$ -Eudesmol	1609	0.8	0.2	0.7	1.2	1.4	0.4	2.2	1.7
T-Cadinol	T-Cadinol	1616	0.2	0.4	0.3	0.2	0.4	0.2		
T-Muuroiol	T-Muuroiol	1616	0.2	0.4	0.4	0.2	0.3	0.2	6.8	5.5
$\alpha$ -Muuroiol (= $\delta$ -Cadinol)	$\alpha$ -Muuroiol (= $\delta$ -Cadinol)	1618	0.2	0.3	0.3	0.1	0.3	0.1	7.1	9.0
$\beta$ -Eudesmol	$\beta$ -Eudesmol	1620	0.8	0.4	0.8	1.3	1.7	1.4	4.4	3.3
$\alpha$ -Cadinol	$\alpha$ -Cadinol	1626	t	t	t	t	t	t		
$\alpha$ -Eudesmol	$\alpha$ -Eudesmol	1634	1.3	1.5	1.9	1.8	2.7	2.1	8.9	6.6
Criptomeriona *	Cryptomerione *	1686	t	t	t	t	t	t	3.9	4.0
Acetato de oplopanoilo *	Oplopanoyl acetate *	1808	t	t	t	t	t	0.1		
Rimueno	Rimueno	1814	t	t	t	t	t	t	t	t
Isopimara-9(11),15-dieno	Isopimara-9(11),15-diene	1821	0.3	0.6	0.7	0.5	0.4	0.3	t	t
NI 1	UI 1	1915	0.4	0.4	1.0	1.0	1.0	1.0	t	t
NI A'	UI A'	1915	t	t	t	t	t	t		
NI 2 (Isokaurene *)	UI 2 (Isokaurene *)	1915	0.1	0.5	1.4	3.1	8.1	1.4		
NI 3	UI 3	1924	0.5	1.2	1.5	1.1	1.4	0.3	t	t
Sandaracopimara-8(14),15-dieno	Sandaracopimara-8(14),15-diene	1956	0.4	0.8	1.2	1.0	1.2	0.3		
Isofilocladeno *	Isophyllocladene *	1956	t	0.1	t	t	t	t		
Filocladeno*	Phyllocladene	2006	5.0	13.0	11.9	11.5	15.1	2.7	t	t
Caureno	Kaurene	2044	1.8	0.2	1.9	1.4	5.7	8.8	0.8	t
Abietadieno	Abietadiene	2060	t	t	t	t	t	t	0.4	0.2
NI 4	UI 4 (Nezukol *)	2176	0.9	1.8	1.7	1.2	3.5	1.1	t	t
Phyllocladanol *	Phyllocladanol *	2200	t	t	t	t	t	t		
Sandaracopimarinal	Sandaracopimarinal	2219							2.6	1.2
<i>trans</i> -Totarol *	<i>trans</i> -Totarol *	2265	t	t	t	t	t	t	1.6	0.8
<b>% Identificação</b>	<b>% identification</b>		98.3	97.8	93.2	96.7	96.9	97.5	80.5	87.4
<b>Componentes agrupados</b>	<b>Grouped components</b>									
Hidrocarbonetos monoterpénicos	Monoterpene hydrocarbons		75.3	64.9	55.1	59.2	42.6	63.9	t	t
Monoterpenos oxigenados	Oxygen-containing monoterpenes		5.7	6.5	1t	7.7	4.4	6.4	t	t
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	Sesquiterpene hydrocarbons		1.6	5.2	2.2	1.2	2.1	2.4	33.1	45.8
Sesquiterpenos oxigenados	Oxygen-containing sesquiterpenes		7.2	4.2	7.1	9.9	13.8	10.1	42.0	39.4
Hidrocarbonetos diterpénicos	Diterpene hydrocarbons		7.6	15.2	17.1	17.5	30.5	13.5	1.2	0.2
Diterpenos oxigenados	Oxygen-containing diterpenes		0.9	1.8	1.7	1.2	3.5	1.1	4.2	2.0
Fenilpropanóides	Phenylpropanoids		t	t	t	t	t	t	t	t
Outros	Others		t	t	t	t	t	0.1	t	t

IR – Índices de retenção calculados relativamente a uma série de  $n$ -alcanos  $C_9$ - $C_{22}$  numa coluna DB-1, \* Identificação baseada apenas no espectro de massa, NI – Compostos não identificados, t – em Português, v: vestigial (<0.05%).

RI - Retention index calculated relative to  $C_9$ - $C_{22}$   $n$ -alkanes on the DB-1 column, \* identification based on mass spectra only, UI – unidentified compounds, t - trace (<0.05%).

**Agradecimentos:** ao CESAM no âmbito do UID/AMB/50017 - POCI-01-0145-FEDER-007638, financiado pela FCT/MCTES e cofinanciado pelo FEDER e Compete 2020, e ao projeto SAI-AZOR/2018/392.

**Acknowledgments:** Thanks are due to CESAM UID/AMB/50017 - POCI-01-0145-FEDER-007638, supported by FCT/MCTES and the co-funding by FEDER and Compete 2020, and to project SAI-AZOR/2018/392.

## Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ ( $^{13}\text{C}$ RMN)

**Projeto:** Valorização de Sobrantes Florestais – Produção, Caracterização e Qualificação de Óleo Essencial de *Cryptomeria japonica* D. Don

**Serviço prestado:** Análise qualitativa de óleos essenciais (OEs) de *Cryptomeria japonica* dos Açores por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$  RMN).

**Produtor:** Azorina S. A.

**Responsável Projeto:** António J. R. M. Almeida / Maria Conceição S. M. Rodrigues

**Email:** Antonio.JR.Almeida@azores.gov.pt; Maria.CSM.Rodrigues@azores.gov.pt

**Nome científico:** *Cryptomeria japonica* D. Don

**Nome comum:** Criptoméria, cedro-japonês

**Locais de recolha:** Achada, Nordeste, São Miguel, (**6A**); Caldeira Velha, Ribeira Grande, São Miguel, (**4A**); Prainha, São Roque, Pico (**4AP**); Prainha, São Roque, Pico, (**4LP**); Encosta Altares, Praia da Vitória, Terceira (**5AT1**), (**5AT2**), (**5AT3**); Serração localizada na Terceira (**AT**), Açores, Portugal.

**Tipo de mata:** Cultivo

**Ano / mês de recolha:** 2019 / 07

**Cota:** 4, 5 e 6

**Tipo de solo:** Andossolo (A) e Litossolo (L)

**Parte da planta:** parte aérea – ramas e bicadas (RB), ramas, bicadas e estróbilos (RB+E); lenho rosa (Lrosa) e lenho negro (Lnegro)

**Método de extração:** Destilação por arrastamento de vapor e aparelho de *Clevenger*

**Amostra:** 8 Óleos essenciais (OE); **6A**; **4A** (São Miguel); **4AP** e **4LP** (Pico); **5AT1**, **5AT2**, **5AT3** (Terceira); **AT** (Serração localizada na Terceira)

**Tabela 1.** Amostras de OEs de *C. japonica* referentes a julho de 2019, condições e rendimento de extração.

Código (ano; mês; cota; tipo de solo; nº da amostra)	Processamento da planta (Estado da planta)	Tempo de destilação (h:min)	Rendimento (%, p/p)
19076A	Amostra não estilhada; RB+E (Floral)	2:04	0,27
19074A	Amostra não estilhada; RB+E (Floral)	2:01	0,20
19074AP	Amostra não estilhada; RB+E (Floral)	2:00	0,17
19074LP	Amostra não estilhada; RB+E (Floral)	2:00	0,19
19075AT1*	Amostra não estilhada; RB	2:06	0,27
19075AT2 <sup>#</sup>	Amostra não estilhada; RB	1:54	?
19075AT3 <sup>#</sup>	Lenho negro (Lnegro)	3:30	0,42
1907AT <sup>#</sup>	Lenho negro (Lrosa)	3:00	?

\*Destilação de arrastamento por vapor na ilha de São Miguel; <sup>#</sup>Destilação em aparelho de *Clevenger*

Em simultâneo com as análises de GC e GC-MS dos OEs procedeu-se à análise por  $^{13}\text{C}$  RMN das 8 amostras de OEs de *C. japonica*, representativas do mês de julho de 2019 fornecidos pela Azorina S.A. (Tabela 1). Assim, seguindo o mesmo procedimento das amostras analisadas dos meses anteriores procedeu-se à análise comparativa da constituição química dos dois OEs da Ilha de São Miguel, **6A** e **4A**, dois OEs da Ilha Pico **4AP** e **4LP** e quatro OEs da Ilha Terceira (**5AT1**, **5AT2**, **5AT3** e **AT**).

Relativamente aos OEs da ilha de São Miguel, o perfil químico de  $^{13}\text{C}$  RMN do OE de julho (1907**6A**) comparativamente ao OE do mês anterior (1906**6A**) da mesma cota e da mesma região, as quantidades de alguns constituintes maioritários variaram ligeiramente. No OE 1907**6A** aumentou ligeiramente o *ent*-caureno

e diminuição também ligeira de filocladeno, sabineno e elemol, tendo-se mantido praticamente iguais o  $\alpha$ -pineno, limoneno, mirceno, terpinen-4-ol,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -terpineno e canfeno (Anexo, Figura 1).

O perfil químico de  $^{13}\text{C}$  RMN do OE de julho, 1907**4A** (Caldeira Velha, Ribeira Grande), da mesma cota e da mesma região, é semelhante ao do OE do mês anterior, 1906**4A2**, observou-se no primeiro o desaparecimento de *ent*-caureno, com redução significativa de elemol, sabineno e terpinen-4-ol. Inversamente, o filocladeno aumentou consideravelmente, detetando-se também um aumento na quantidade de limoneno,  $\alpha$ -pineno, acetato de bornilo e canfeno (Anexo, Figura 2).

Procedeu-se à análise dos OEs do mês de julho da ilha do Pico extraídos por arrastamento de vapor na própria ilha. Relativamente ao mês anterior, no OE 1907**4AP** identificou-se uma redução na quantidade de todos os constituintes com exceção do sabineno que aumentou ligeiramente (Anexo, Figura 3). No OE (1907**4LP**) da mesma cota, local e de litossolos relativamente ao mês anterior, 1906**4LP**, diminui a quantidade de sabineno, limoneno, elemol,  $\alpha$ -pineno e mirceno. Como no mês anterior não se detetou *ent*-caureno (Anexo, Figura 4).

No que respeita aos quatro OEs da Ilha Terceira, dois destes OEs são provenientes das ramas e bicadas da Encosta Altares, Praia da Vitória, por arrastamento de vapor, destilados na ilha de São Miguel, OE 1907**5AT1**, e por destilação em *Clevenger*, OE 1907**5AT2**. Também, por destilação de *Clevenger* de madeira rosa moída, AT, e madeira negra, 5AT3, duma serração da Terceira, produziram-se os OEs 1907**AT** e 1907**5AT3**.

Da análise comparativa dos perfis químicos dos OEs 1907**5AT1** (arrastamento de vapor) e 1907**5AT2** (hidrodestilação) observou-se que no processo de destilação por arrastamento de vapor a quantidade de sabineno e filocladeno aumenta enquanto que o  $\alpha$ -pineno e o *ent*-caureno diminuem consideravelmente. Não se detetou grande variação na quantidade de  $\alpha$ -pineno, elemol e mirceno, embora o acetato de bornilo e canfeno tenham diminuído ligeiramente (Anexo, Figura 5).

Os perfis dos OEs das madeiras rosa e negra, OEs 1907**AT** e 1907**5AT3**, apresentam uma constituição química diferente dos OEs de ramas e bicadas até agora analisados. Nestes OEs não foram detetados monoterpenos,  $\alpha$ -pineno, sabineno, limoneno, mirceno, canfeno, nem diterpenos do tipo filocladeno e *ent*-caureno. Contudo, ambos os OEs de madeira têm semelhante perfil químico, sendo constituídos maioritariamente por sesquiterpenos oxigenados. O OE de madeira rosa, 1907**AT**, é mais rico na sua constituição química embora o tempo de destilação fosse ligeiramente inferior ao do OE de madeira negra, 1907**5AT3**. Nestes OEs detetaram-se maioritariamente, cubebol e o seu epímero epi-cubebol, isómeros do eudesmol ( $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\alpha$ ), cubenol e o seu epímero epi-cubenol e elemol. Também foi detetada a presença de criptomeriona já identificada e referenciada noutros óleos de criptoméria (Anexo, Figura 6).

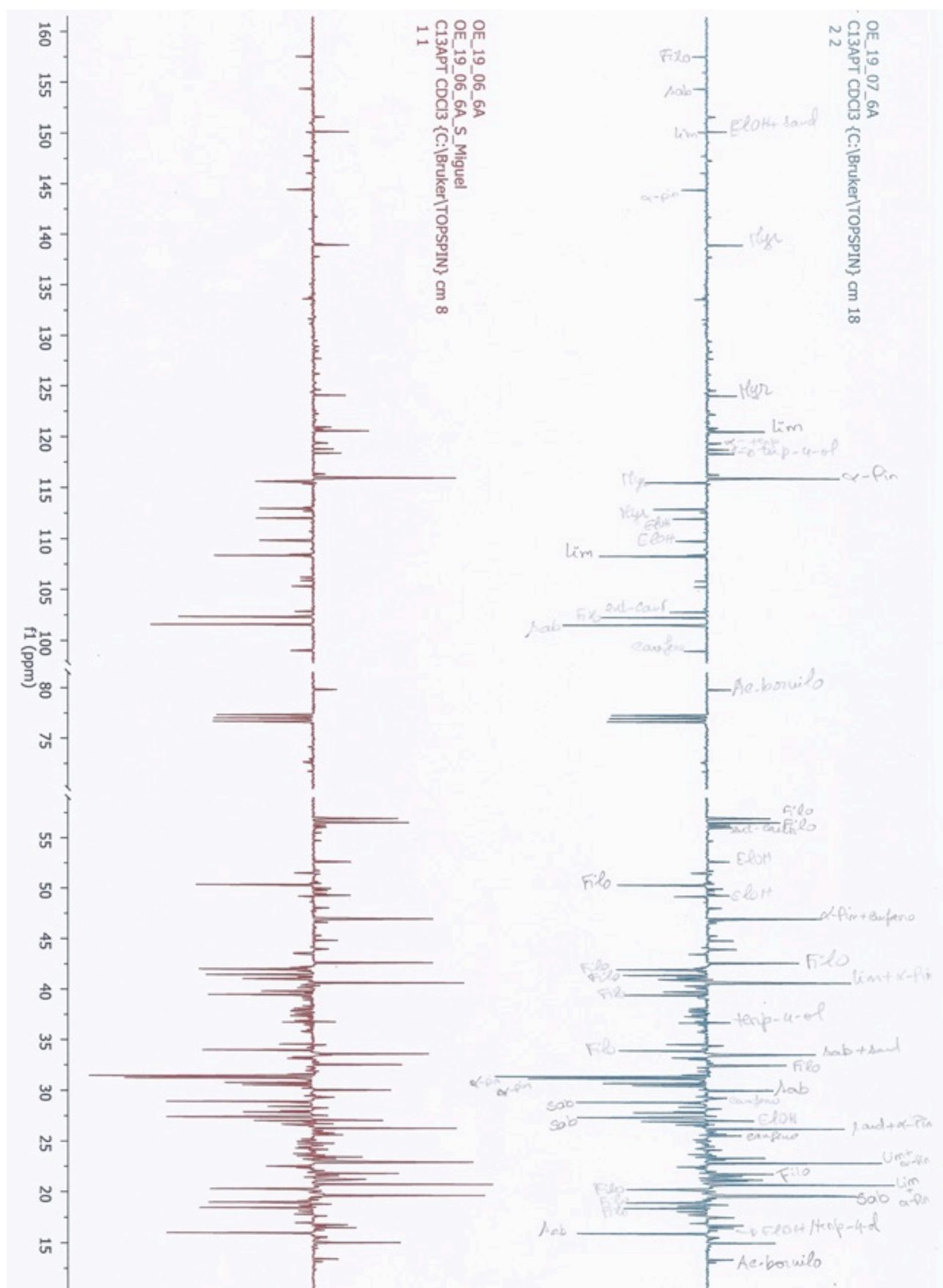


Figura 1. Comparação dos espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN (APT) dos OEs de **19076A** e **19066A** da ilha de São Miguel em  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  10 – 170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos:  **$\alpha$ -Pin**-  $\alpha$ -Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno;  **$\alpha$ - e  $\gamma$ -Terp** –  $\alpha$ - e  $\gamma$ -Terpineno; **Terp-4-ol**- Terpinen-4-ol; **EIOH**- Elemol; **Filo** –Filocladeno; **ent-Caur** – ent-Caureno; **Sand** – Sandaracopamaradieno; **Ac. bornilo** – acetato de bornilo; canfeno.

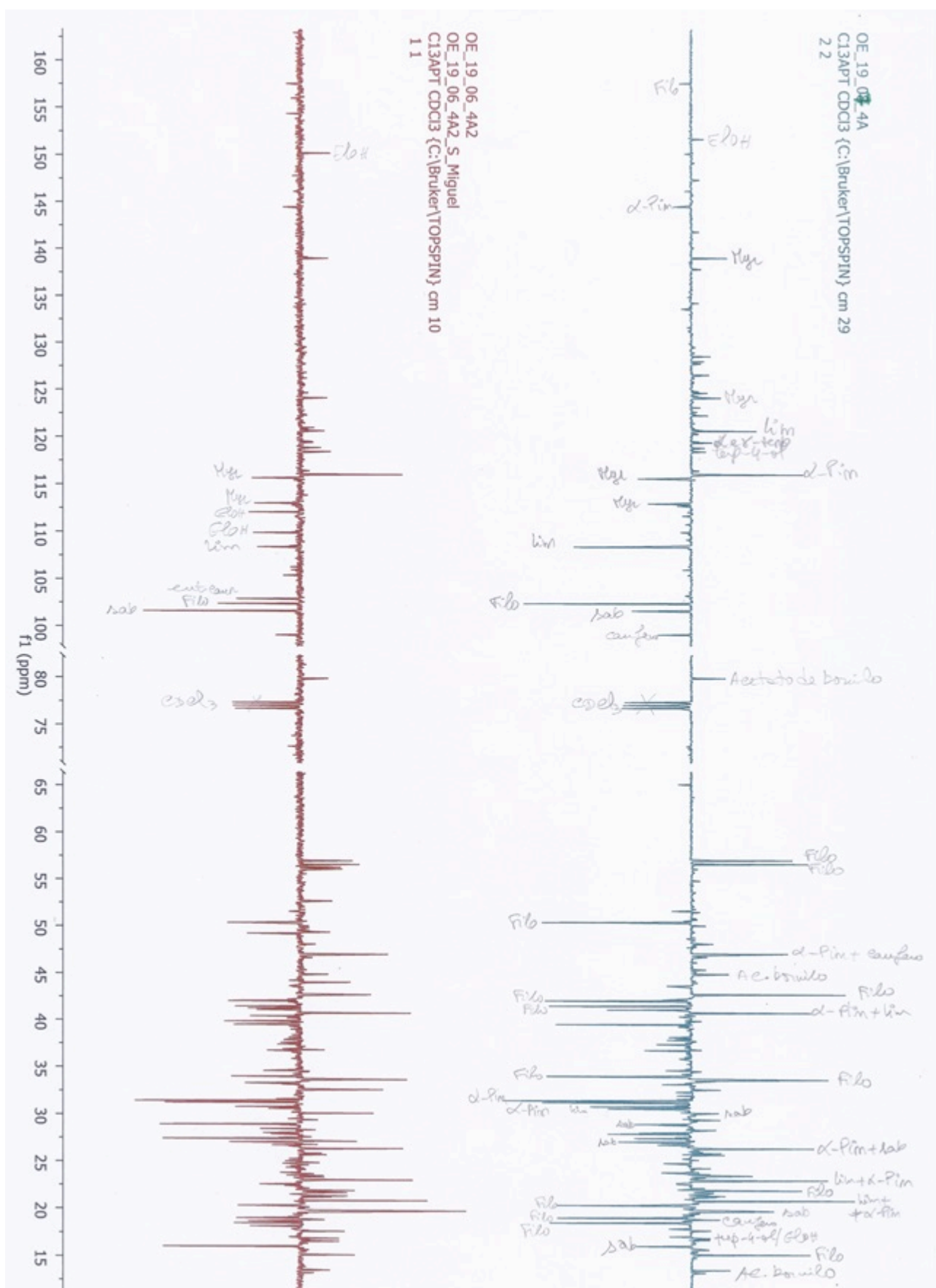


Figura 2- Comparação dos espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN (APT) dos OEs de **19074A** e **19074A2** da ilha de São Miguel, em  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  10–170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos:  **$\alpha$ -Pin** –  $\alpha$ -Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno;  **$\alpha$ - e  $\gamma$ -Terp** –  $\alpha$ - e  $\gamma$ -Terpineno; **Tern-4-ol** – Terpinen-4-ol; **EIOH** – Elemol; **Filo** – Filocladeno; **ent-Caur** – *ent*-Caureno; **Sand** – Sandaracopamaradieno; **Ac. bornilo** – Acetato de bornilo; canfero.

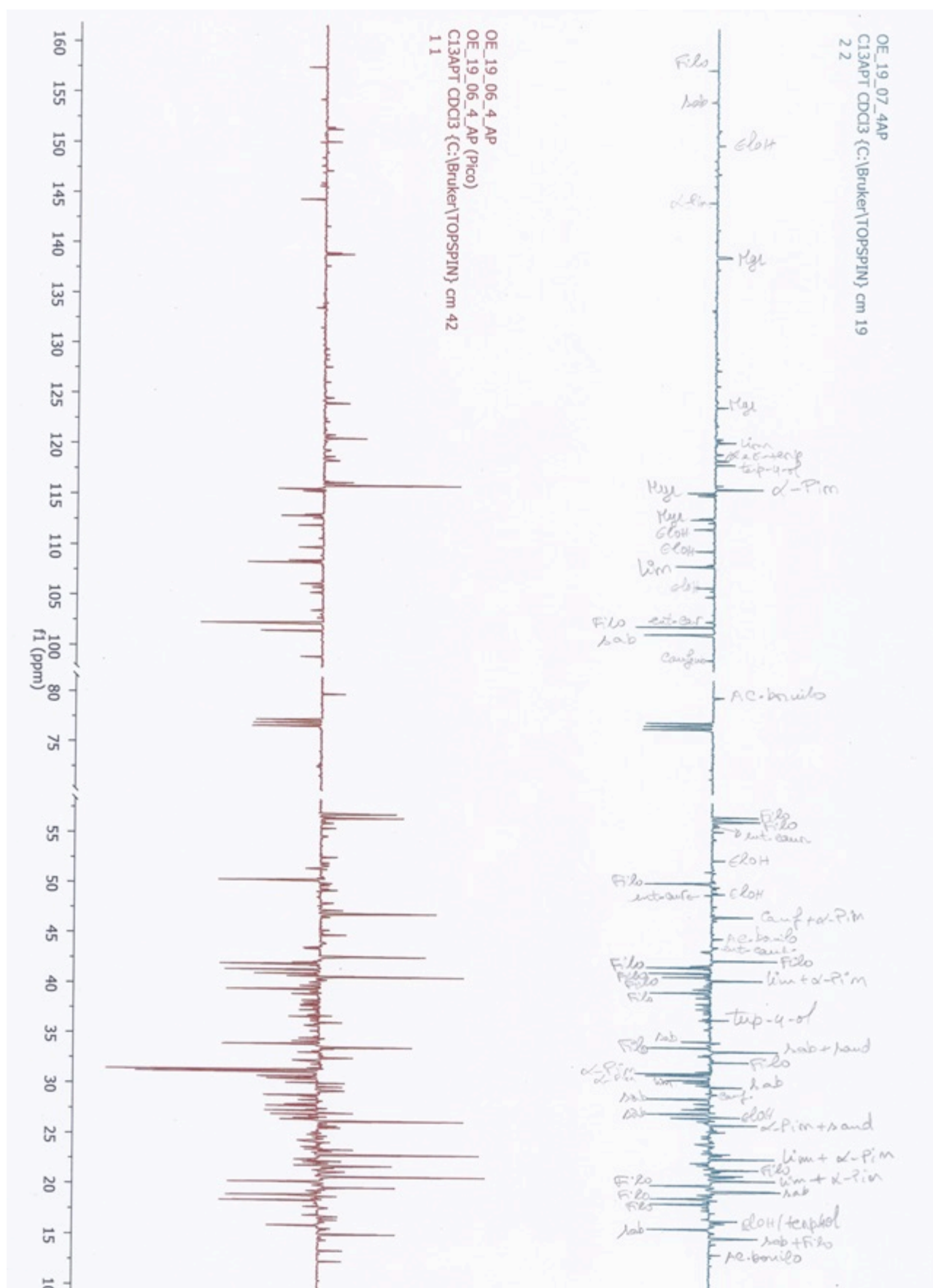


Figura 3- Espectro comparativo dos  $^{13}\text{C}$  RMN (APT) dos OEs de **19074AP** e **19064AP** da ilha do Pico, em  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  10 – 170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos:  **$\alpha$ -Pin** –  $\alpha$ -Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno;  **$\alpha$ -** e  **$\gamma$ -Terp** –  $\alpha$ - e  $\gamma$ -Terpineno; **Tern-4-ol** – Terpinen-4-ol; **EIOH** – Elemol; **Filo** – Filocladeno; **ent-Caur** – *ent*-Caureno; **Sand** – Sandaracopamaradieno; **Ac. bornilo** – Acetato de bornilo; canfeno.

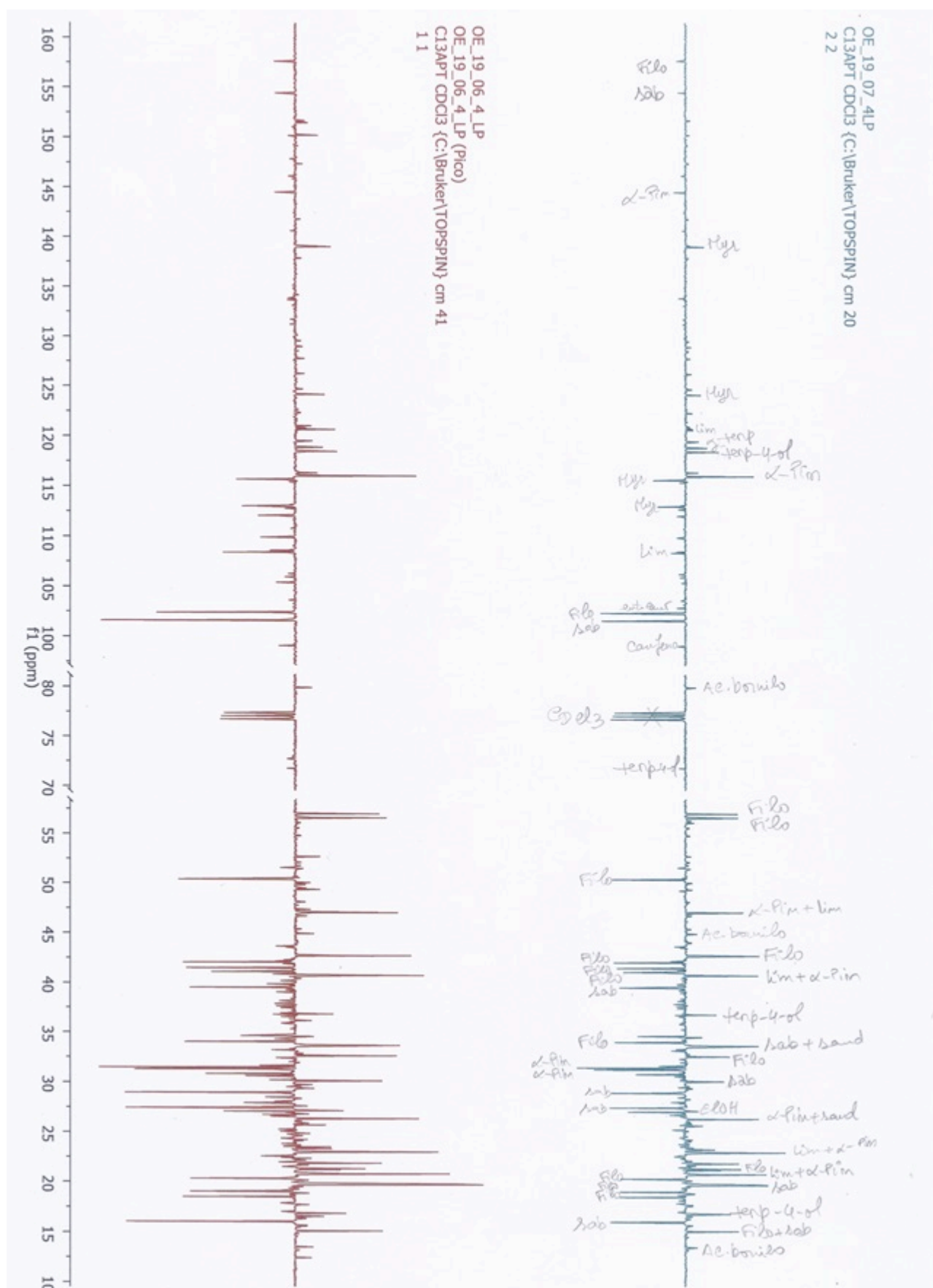


Figura 4- Espectro comparativo dos  $^{13}\text{C}$  RMN (APT) dos OEs de **19074LP** e **19064LP** da ilha do Pico em  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  10 – 170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos:  **$\alpha$ -Pin** –  $\alpha$ -Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno;  **$\alpha$ - e  $\gamma$ -Terp** –  $\alpha$ - e  $\gamma$ -Terpineno; **Tern-4-ol** – Terpinen-4-ol; **EIOH** – Elemol; **Filo** – Filocladeno; **ent-Caur** – *ent*-Caureno; **Sand**- Sandaracopamaradieno; **EudOH** – Eudesmol; **Ac. bornilo** – Acetato de bornilo; canfeno.

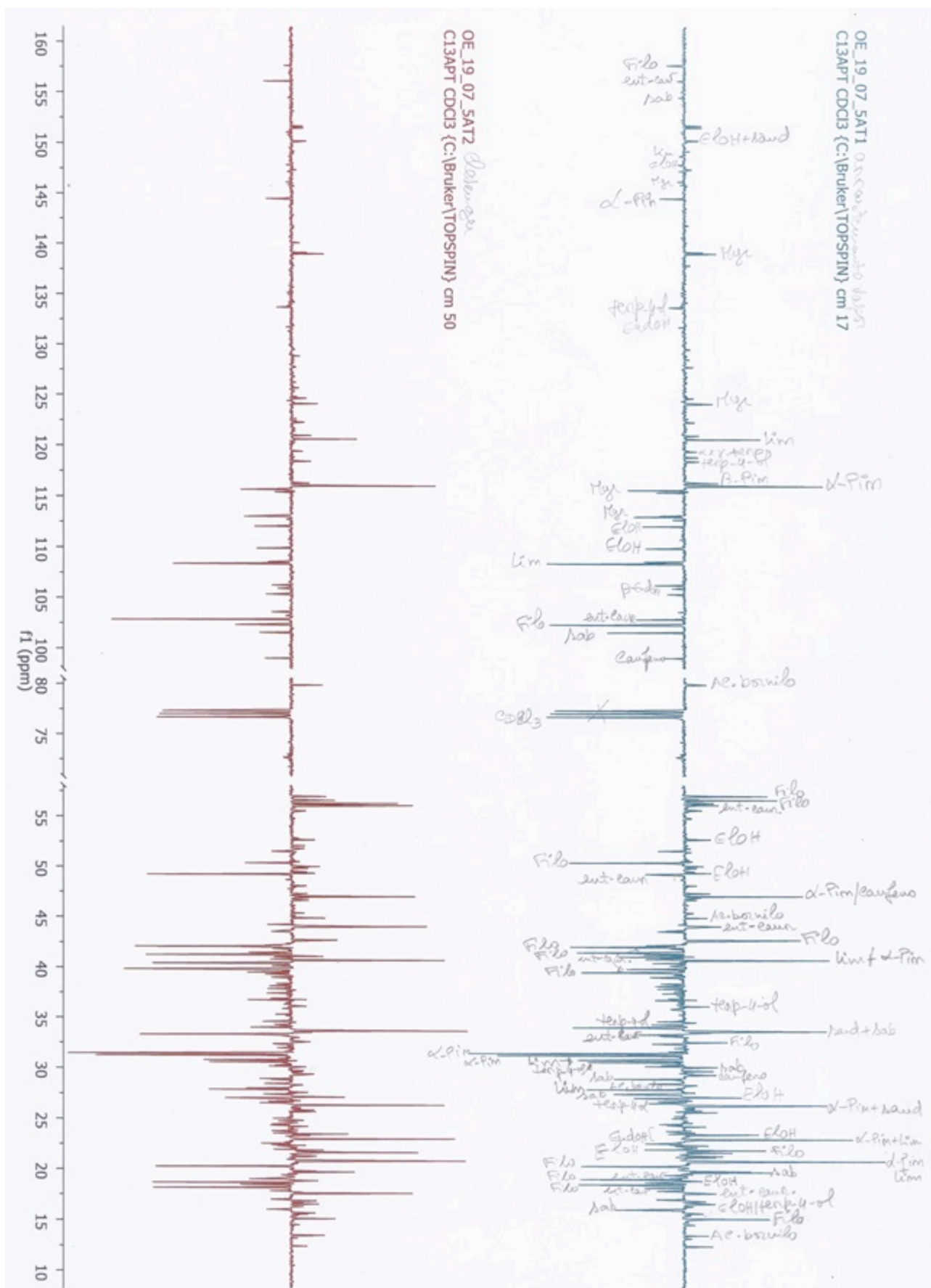


Figura 5- Espectro comparativo dos  $^{13}\text{C}$  RMN (APT) dos OEs de **19075AT1** (arrastamento de vapor) e **19075AT2** (hidrodestilação) da ilha Terceira em  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  10 –170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos:  **$\alpha$ -Pin** –  $\alpha$ -Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno;  **$\alpha$ -e  $\gamma$ -Terp** –  $\alpha$ -e  $\gamma$ -Terpineno; **Terp-4-ol** – Terpinen-4-ol; **EIOH** – Elemol; **Filo** – Filocladeno; **ent-Caur** – *ent*-Caureno; **Sand**- Sandaracopamaradieno; **EudOH** – Eudesmol; **Ac. bornilo** – Acetato de bornilo; canfeno.



## Analysis by $^{13}\text{C}$ Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ( $^{13}\text{C}$ NMR)

**Project:** Valorisation of Forestry Residues – Production, Characterization and Quantification of Essential Oils of *Cryptomeria japonica* D. Don

**Service provided:** Qualitative Analysis of Essential Oils (EOs) of *Cryptomeria japonica* from Azores by  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ( $^{13}\text{C}$  NMR).

**Producer:** Azorina S. A.

**Project manager:** António J. R. M. Almeida / Maria Conceição S. M. Rodrigues

**Email:** Antonio.JR.Almeida@azores.gov.pt; Maria.CSM.Rodrigues@azores.gov.pt

**Scientific name:** *Cryptomeria japonica* D. Don

**Common name:** Japanese cedar; Sugi

**Place of collection:** Achada, Northeast, São Miguel, (**6A**); Caldeira Velha, Ribeira Grande, São Miguel, (**4A**); Prainha, São Roque, Pico (**4AP**); Prainha, São Roque, Pico, (**4LP**); Encosta Altares, Praia da Vitória, Terceira (**5AT1**), (**5AT2**), (**5AT3**); sawmill located at Terceira (**AT**) Azores, Portugal.

**Type of forest:** Cultivar

**Production Year / production month:** 2019 / 07

**Quota:** 4, 5 and 6

**Type of soils:** Andosol (A); Lithosol (L)

**Part of plant:** Aerial parts – Branches (RB), strobilus and branches (RB+E), pink wood chips (Lrosa) and black wood chips (Lnegro)

**Extraction procedure:** Steam-distillation

**Sample:** 8 Essential Oils (EOs); **6A**, **4A** (São Miguel Island); **4LP** and **4AP** (Pico Island), **5AT1**, **5AT2**, **5AT3** (Terceira); **AT** (sawmill located at Terceira)

**Table 1.** Samples of *C. japonica* EOs collected in July 2019 and extraction conditions.

Code (year; month; quota; soil type; sample number)	Plant processing (plant state)	Distillation time (h:min)	Yield (%, w/w)
19076A	Uncut; RB+E (Floral)	2:04	0.27
19074A	Uncut; RB+E (Floral)	2:01	0.20
19074AP	Uncut; RB+E (Floral)	2:00	0.17
19074LP	Uncut; RB+E (Floral)	2:00	0.19
19075AT1*	Uncut; RB	2:06	0.27
19075AT2 <sup>#</sup>	Uncut; RB <sup>#</sup>	1:54	?
19075AT3 <sup>#</sup>	Black wood chips (Lnegro) <sup>#</sup>	3:30	0.42
1907AT <sup>#</sup>	Pink wood chips (Lrosa) <sup>#</sup>	3:00	?

\*Steam-distillation at Pico Island; <sup>#</sup>Hidrodistillation.

Eight samples of *C. japonica* EOs, representative of July 2019 provided by Azorina S.A. (Table 1), were analyzed by the  $^{13}\text{C}$  NMR technique and simultaneously with the GC and GC-MS analyses. Thus, following the same procedure used for the other samples from previous months, a comparative analysis of the chemical constituents of the two EOs, **6A**, **4A**, from São Miguel Island, two EOs **4AP**, **4LP** from Pico Island and four EOs **5AT1**, **5AT2**, **5AT3**, **AT** from Terceira was progressed.

In relation to  $^{13}\text{C}$  NMR chemical profiles of EOs from São Miguel Island, **19076A** and **19066A** are similar with minor variations in their major constituents. In the EO **19076A**, the content of *ent*-kaurene increase while, the

composition of sabinene and elemol decrease. No variation was observed in  $\alpha$ -pinene, limonene, myrcene, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -,  $\gamma$ -terpinene and camphene (Annex, Figure 1).

The chemical profile July (1907**4A**) and June (1906**4A2**) of EOs from same quota and region Caldeira Velha, Ribeira Grande, São Miguel are also equivalent. By comparison, the EO 1907**4A** contains an increase of phyllocladane, limonene,  $\alpha$ -pinene, bornyl acetate and camphene while elemol, sabinene and terpinen-4-ol has a substantial decrease. The presence of *ent*-kaurene was not detected. (Annex, Figure 2).

Comparing the EOs 1907**4AP** and 1906**4AP** from Pico Island, a reduction of almost all constituents was observed in 1907**4AP**, except in sabinene content that increase slightly (Annex, Figure 3). In EO (1907**4LP**) the content of sabinene, limonene, elemol,  $\alpha$ -pinene and myrcene decrease whereas *ent*-kaurene remains not detected when compared with previous month EO 1906**4LP** (Annex, Figure 4).

Regarding to the four EOs (1907**5AT1**, 1907**5AT2** 1907**AT** and 1907**5AT3**) from Terceira Island, two of them were obtained from aerial part – branches collected in Encosta Altares, Praia da Vitória by steam distillation in São Miguel Island, 1907**5AT1**, and distillation with *Clevenger* Apparatus, 1907**5AT2**. Also, EOs 1907**AT** and 1907**5AT3** were obtained by hydrodistillation from pink wood chips (**AT**) and black wood chips (**5AT3**) collected in a sawmill at Terceira Island.

Comparing the chemical profiles of EOs 1907**5AT1** (steam distillation) and 1907**5AT2** (hydrodistillation) it can be observed that, in 1907**5AT1** the content of sabinene and phyllocladane increase while  $\alpha$ -pinene and *ent*-kaurene considerably decrease. No variations were observed in  $\alpha$ -pinene, elemol e myrcene however, slightly decrease was detected in bornyl acetate and camphene (Annex, Figure 5).

Related the EOs from wood chips, 1907**AT** and 1907**5AT3**, a distinct chemical profile was observed when compared with all EOs from aerial parts already analyzed. Monoterpenes such as  $\alpha$ -pinene, sabinene, limonene, myrcene, camphene and diterpenes like phyllocladane and *ent*-kaurene were not detected. However, these EOs (1907**AT** and 1907**5AT3**) have a similar chemical profile mainly containing oxygenated sesquiterpenes in their composition. Although, the distillation time of EO1907**AT** has been lesser than EO1907**5AT3**, the chemical composition of the first one is richer than EO from black wood chips, 1907**5AT3**. Oxygenated sesquiterpenes as cubebol, cubenol and theirs epimers, epi-cubebol, epi-cubenol, eudesmol isomers ( $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\alpha$ ), and elemol were essentially identified in these EOs. It also detected the presence of criptomerione already identified and referenced in other EOs from *Cryptomeria*. (Annex, Figure 6).

Figures 1, 2, 3, 4, 5 and 6 were illustrated in pages 8 to 13.

**Acknowledgments:** Thanks are due to CQB, UID/MULTI/0062/2013 project funding by FCT/MCTES and to project SAI-AZOR/2018/392.