

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, 2018

July, 2018



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 Espetrometria de Massa (GC-MS)	1
Analysis by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS).....	1
 CQB	 5
Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (^{13}C RMN)	5
Analysis by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^{13}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	Antonio.JR.Almeida@azores.gov.pt Maria.CSM.Rodrigues@azores.gov.pt

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	June de 2018 / June 2018
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	Destilação por arrastamento de vapor / Steam-distillation
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 Junho 2018.

Table 1. Data on *Cryptomeria japonica* essential oils samples, isolated in June 2018.

<i>Cryptomeria japonica</i> (L. fil.) D. Don				Óleo Essencial / Essential Oil		
Tipo de material	Sample type	Origem / Provenance		TD DT (h:min)	R Yield (%, v/p)	Código Code
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	2:00	0.19
Ramadas e bicadas	Lote estilhado (2h)	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	2:00	0.25
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Lomba de São Pedro, Ribeira Grande, São Miguel, Açores	2:00	0.21
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Cora da Mata, Ribeirinha, Ribera Grande, São Miguel, Açores	2:05	0.18

TD: Tempo de destilação. DT: Distillation time. R: Rendimento.

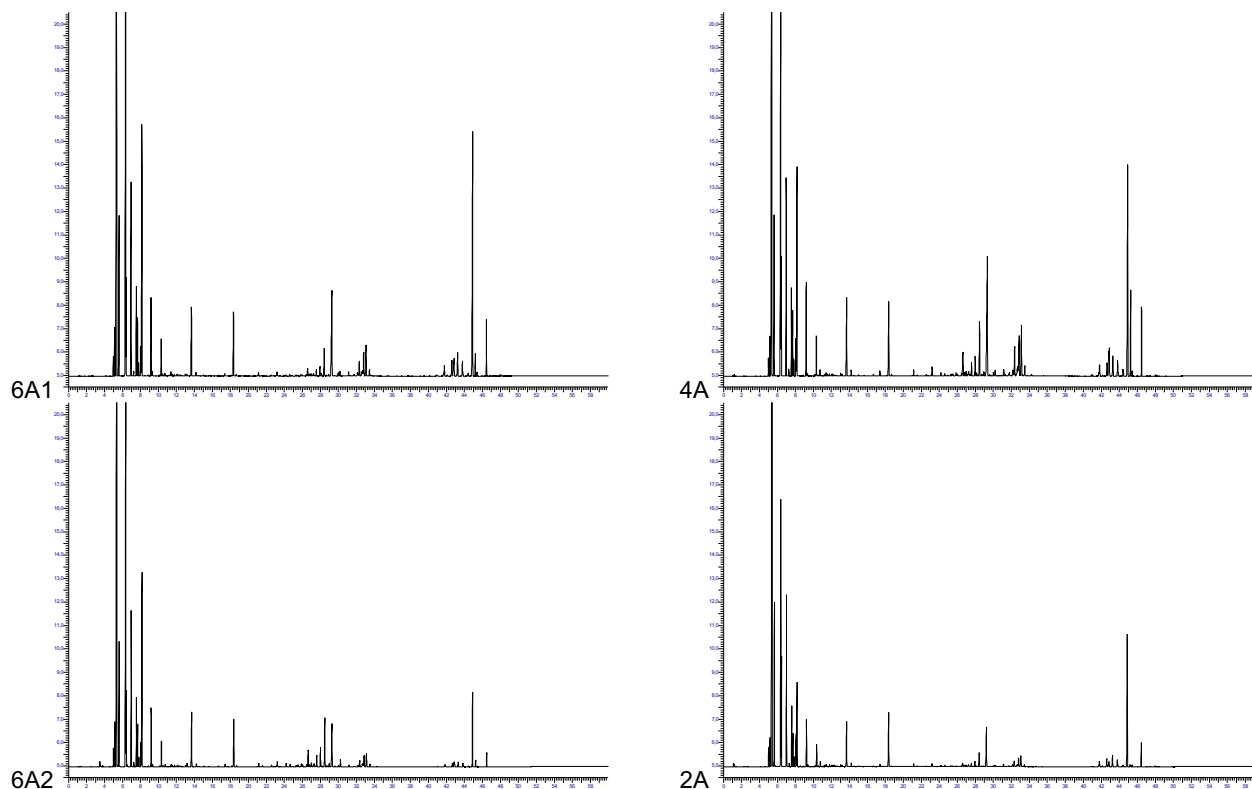


Fig. 1. Perfis cromatográficos das amostras analisadas. / **Fig. 1.** Gas chromatography profiles, taken on the DB-1 column, of the essential oils isolated from *Cryptomeria japonica* samples (for sample codes, see Table 1).

Tabela 2. Composição percentual das amostras de óleo essencial de *Cryptomeria japonica* isoladas em Junho 2018 (para códigos das amostras *vide* Tabela 1).

Table 2. Percentage composition of the essential oils isolated from *Cryptomeria japonica* samples in June 2018 (for sample codes, *vide* Table 1).

Componentes	Components	IR / RI	1806 6A1	1806 6A2	1806 4A	1806 2A
Triciclono	Tricyclene	921	0.2	0.4	0.2	0.5
α -Tujeno	α -Thujene	924	1.1	1.2	0.7	1.1
α -Pineno	α -Pinene	930	28.4	36.2	31.2	48.9
Canfeno	Camphene	938	2.7	3.0	2.6	4.4
Sabineno	Sabinene	958	14.8	16.3	12.0	11.3
β -Pineno	β -Pinene	963	1.5	1.6	1.2	1.1
β -Mirceno	β -Myrcene	975	4.5	4.8	4.1	5.7
α -Felandreno	α -Phellandrene	995	0.1	0.1	0.1	t
δ -3-Careno	δ -3-Carene	1000	1.9	2.1	1.6	1.9
α -Terpineno	α -Terpinene	1002	1.2	1.2	1.2	1.0
<i>p</i> -Cimeno	<i>p</i> -Cymene	1003	0.3	0.3	0.3	0.3
β -Felandreno	β -Phellandrene	1005	0.7	0.8	0.8	1.0
Limoneno	Limonene	1009	7.6	7.3	4.9	2.6
<i>cis</i> - β -Ocimeno	<i>cis</i> - β -Ocimene	1017	t	t	t	t
<i>trans</i> - β -Ocimeno	<i>trans</i> - β -Ocimene	1027	t	t	t	t
γ -Terpineno	γ -Terpinene	1035	1.9	1.9	2.0	1.5
Hidrato de <i>trans</i> -sabineno	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1037	0.1	0.1	t	t
2,5-Dimetil estireno	2,5-Dimethyl styrene	1059	t	t	t	t
Terpinoleno	Terpinolene	1064	0.9	0.9	0.9	0.7
Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1066	0.1	t	t	t
Linalol	Linalool	1074	0.1	t	0.2	0.2
Acetato de 1-octen-3-ilo	1-Octen-3-yl acetate	1086	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	0.1	0.1	t	t
Cânfora	Camphor	1102	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	t
Borneol	Borneol	1134	t	t	t	t
Terpinen-4-ol	Terpinen-4-ol	1148	2.3	2.4	2.4	1.8
α -Terpineol	α -Terpineol	1159	0.1	0.2	0.2	0.2
Acetato de α -fenchilo	α -Fenchyl acetate	1200	t	t	t	t
Acetato de linalilo	Linalyl acetate	1245	0.1	0.1	0.1	t
Acetato de bornilo	Bornyl acetate	1265	2.1	2.1	2.2	2.3
Acetato de α -terpenilo	α -Terpenyl acetate	1334	0.1	0.2	0.2	0.1
α -Cubebeno	α -Cubebene	1345	0.2	t	t	t
α -Copaeno	α -Copaene	1375	t	0.1	t	t
β -Bourboneno	β -Bourbonene	1379	t	t	t	t
β -Elemeno	β -Elemene	1388	t	0.3	0.3	0.1
β -Cariofileno	β -Caryophyllene	1414	t	t	t	t
β -Copaeno	β -Copaene	1426	t	0.1	t	t
α -Humuleno	α -Humulene	1447	t	0.1	t	t
γ -Muuroleno	γ -Muurolene	1469	t	0.1	t	t
Germacreno D	Germacrene D	1474	0.4	1.0	0.9	0.2
Biciclogermacreno	Bicyclogermacrene	1487	0.1	0.2	0.2	0.1
α -Muuroleno	α -Muurolene	1494	0.2	0.6	0.4	0.1
γ -Cadineno	γ -Cadinene	1500	0.4	0.9	0.6	0.2
<i>trans</i> -Calameneno	<i>trans</i> -Calamenene	1505	0.1	t	0.1	t
δ -Cadineno	δ -Cadinene	1505	0.9	2.4	1.7	0.6
Elemol	Elemol	1530	4.1	2.2	5.5	1.9
Germacreno D-4-ol *	Germacrene D-4-ol *	1557	0.2	0.3	0.2	t
Óxido de β -cariofileno	β -Caryophyllene oxide	1561	t	t	t	t
Anidrooplopanona	Anhydrooplopanone	1576	0.2	0.1	0.2	t
γ -Eudesmol	γ -Eudesmol	1609	0.5	0.3	0.9	0.3
T-Cadinol	T-Cadinol	1616	0.2	0.3	0.3	t
T-Muurolol	T-Muurolol	1616	t	t	0.3	t
β -Eudesmol	β -Eudesmol	1620	0.9	0.5	1.6	0.4
α -Eudesmol	α -Eudesmol	1634	1.2	0.8	1.8	0.6
Criptomeriona*	Cryptomerione*	1686	t	t	t	t

Componentes	Components	IR / RI	1806 6A1	1806 6A2	1806 4A	1806 2A
Rimueno	Rimueene	1814	t	t	t	t
Isopimara-9(11),15-dieno	Isopimara-9(11),15-diene	1821	0.4	0.2	0.5	0.3
NI 1	UI 1	1915	0.6	0.2	0.5	0.4
NI 2	UI 2	1915	0.6	0.5	0.9	0.3
NI 3	UI 3	1924	0.9	0.3	0.7	0.6
Sandaracopimara-8(14),15-dieno	Sandaracopimara-8(14),15-diene	1956	0.6	0.2	0.6	0.4
Filocladeno*	Phyllocladene	2006	10.3	2.9	7.5	5.6
Caureno	Kaurene	2044	0.5	0.2	1.8	t
Abietadieno	Abietadiene	2060	t	t	t	t
NI 4	UI 4	2176	1.3	0.4	1.3	0.7
% Identificação	% identification		94.3	97.1	94.5	97.4
Componentes agrupados	Grouped components					
Hidrocarbonetos monoterpénicos	Monoterpene hydrocarbons		67.8	78.1	63.8	82.0
Monoterpenos oxigenados	Oxygen-containing monoterpenes		5.1	5.2	5.3	4.6
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	Sesquiterpene hydrocarbons		2.3	5.8	4.2	1.3
Sesquiterpenos oxigenados	Oxygen-containing sesquiterpenes		7.1	4.4	10.6	3.2
Hidrocarbonetos diterpénicos	Diterpene hydrocarbons		11.8	3.5	10.4	6.3
Outros	Others		0.2	0.1	0.2	t

IR – Índices de retenção calculados relativamente a uma série de *n*-alcanos C₉-C₂₂ numa coluna DB-1, * Identificação baseada apenas no espetro de massa, NI – Compostos não identificados, t – em Português, v: vestigial (<0.05%).

RI - Retention index calculated relative to C₉-C₂₂ *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.



GOVERNO
DOS AÇORES



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu de
Desenvolvimento Regional

Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (^{13}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}C (^{13}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: Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores, Portugal (Mata ca. 50 anos); Lomba de São Pedro, Ribeira Grande, São Miguel, Açores, Portugal e Cora da Mata, Ribeirinha Grande, São Miguel, Açores, Portugal (Mata ca. 40 anos).

Tipo de mata: Cultivo

Ano / mês de recolha: 2018 / 06

Cota: 6, 4 e 2

Tipo de solo: Andossolo (A)

Parte da planta: parte aérea – ramadas e bicadas

Método de extração: Destilação por arrastamento de vapor

Amostra: 4 óleos essenciais (OEs); **A1; A2; 4A e 2A**

Tabela 1. Código das amostras recebidas em junho de 2018 e condições de extração dos OEs de *C. japonica*.

Código (ano; mês; cota; tipo de solo; número da amostra)	Processamento da planta	Tempo de destilação (h:min)	Rendimento (%, v/p)
18066A1	Amostra não estilhada	2:00	0,19
18066A2	Amostra estilhada	2:00	0,25
18064A	Amostra não estilhada	2:00	0,21
18062A	Amostra não estilhada	2:05	0,18

Em simultâneo com as análises de GC e GC-MS dos OEs procedeu-se à análise por ^{13}C RMN das quatro amostras de OEs de *C. japonica*, representativas do mês de junho de 2018 fornecidos pela Azorina S.A.. Assim, seguindo o mesmo procedimento das amostras analisadas do mês de maio, procedeu-se à análise comparativa da constituição química dos quatro OEs, **A1; A2; 4A e 2A**.

Como se pode observar na Tabela 1, os rendimentos de extração dos OEs variam independentemente do tempo de extração e da origem das ramadas e bicadas. Os rendimentos de OEs para as amostras do mês de junho, com o mesmo tempo de destilação, são ligeiramente inferiores aos do mês de maio de 2018. Amostras de ramadas e bicadas, estilhadas ou não estilhadas, do mesmo local de recolha (Achadinha, Nordeste, Açores, Portugal) e com a mesma cota, apresentam um rendimento de extração diferente. Assim, amostras de plantas não estilhadas apresentam um rendimento de extração de OE (18066A1) ligeiramente inferior ao obtido de plantas estilhada (18066A2). Esta variação também já tinha sido detetada nas amostras do mês de maio de 2018.

O perfil químico de ^{13}C RMN das amostras de OEs 18066A1 e 18066A2 (mesmo local e mesma cota) são semelhantes. Contudo, o OE 18066A2 obtido da planta estilhada apresenta uma constituição química mais pobre do que o OE 18066A1 da planta não estilhada (Figura 1). Esta variação também já tinha sido observada com as amostras do mês de maio.

Da análise comparativa dos espectros dos dois OEs de criptoméria com amostras padrão, verifica-se que estas amostras contêm maioritariamente compostos do tipo hidrocarbonetos monoterpénicos, **α -pineno** e **sabineno**, que constituem ca. de 50% da percentagem total dos OEs. Outros compostos voláteis como mirceno, limoneno e α -terpineno foram também detetados em menores percentagens, seguidos de compostos oxigenados como terpinen-4-ol, elemol, entre outros (Figuras 2; 2.1 e 3, 3.1). À semelhança dos OEs do mês anterior, também foram detetados diterpenos do tipo filocladeno, *ent*-caureno e sandacopamaradieno, entre outros não identificados. Saliente-se que, no OE obtido da planta estilhada (18066A2) observa-se uma redução na composição em diterpenos, filocladeno e sandacopamaradieno mas um ligeiro aumento nos monoterpénicos α -pineno e sabineno (Figuras 1, 3 e 3.1).

Ramadas e bicadas de criptoméria oriundas de locais e cotas distintas, originaram OEs, 18066A1 e 18064A, com perfis químicos de ^{13}C RMN semelhante (Figuras 4). Ambos os OEs contêm maioritariamente, α -pineno e sabineno (ca. de 50% da percentagem total do OE), sendo também detetado em menores percentagens, mirceno, limoneno, α -terpineno, terpinen-4-ol e elemol, seguido de uma fração de diterpenos de filocladeno, *ent*-caureno e sandacopamaradieno.

O OE 18062A resultante de amostras de ramadas e bicadas da Cora da Mata, Ribeirinha Grande, São Miguel, Açores (mata ca. 40 anos e cota 2) distingue-se das outras amostras de óleos analisadas. Maioritariamente este OE é constituído por α -pineno e sabineno, com um aumento da percentagem do primeiro e redução do segundo. Todos os outros compostos, como limoneno e elemol também existem, mas em percentagens ainda mais reduzidas, sucedendo o mesmo com a fração de diterpenos, não se tendo detetado *ent*-caureno (Figura 5).

OE18_06_6_A1
criptomeria amostra OE18/06-6A1
RMN realizado a 06/07/18
C13APT CDC13 {C:\Bruker\TOPSPIN} cm 11

OE_18_06_6_A2
Criptomeria amostra OE18/06-6A2
RMN realizado a 03/07/18
C13APT CDC13 {C:\Bruker\TOPSPIN} cm 1

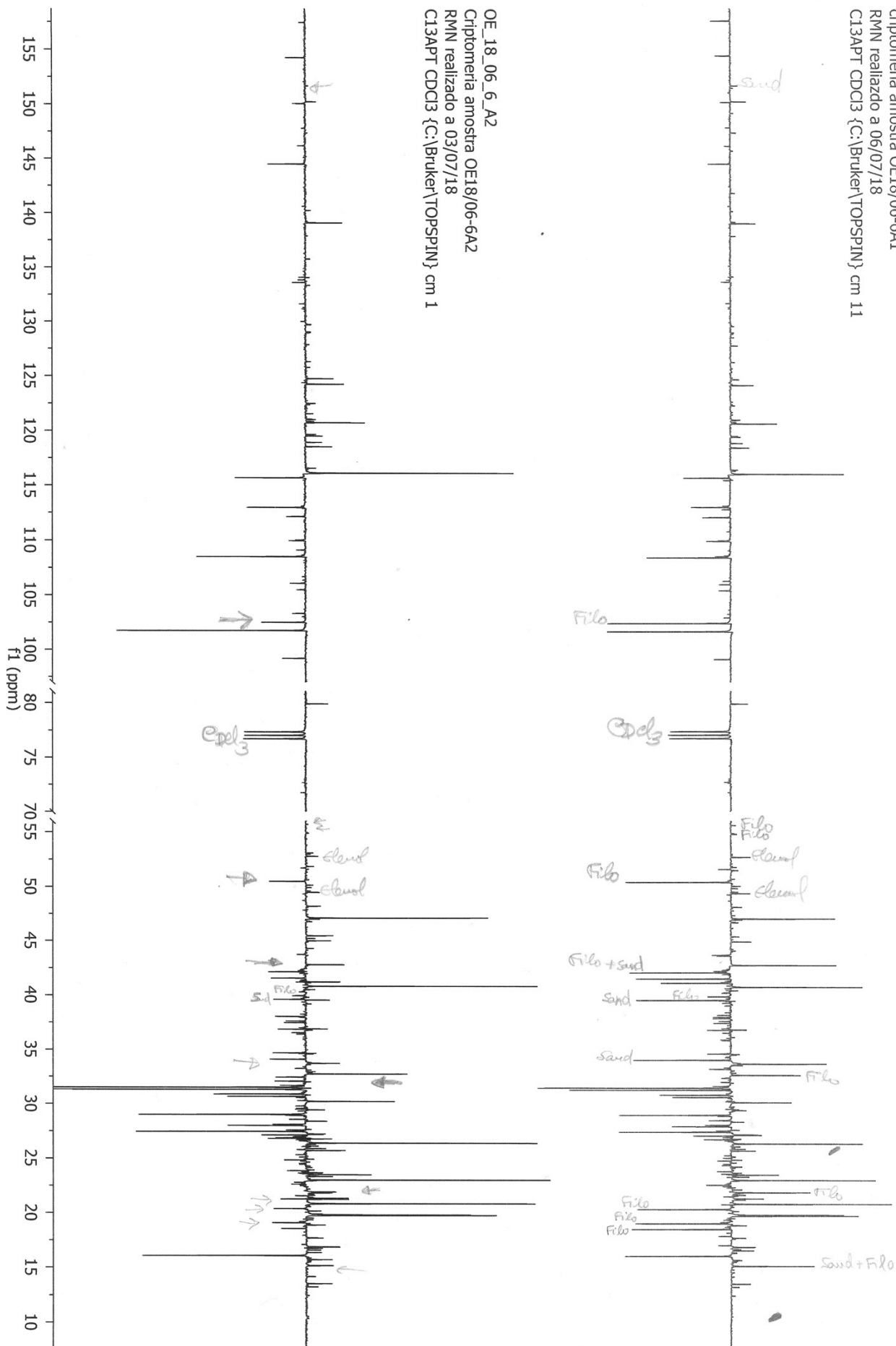


Figura 1. Comparação dos espectros de ^{13}C RMN (APT) dos OEs de 18066A1 e 118066A2 em CDCl_3 (δ 10 – 160 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: **Filo**- Filocladeno; **Sand**- Sandacopamaradieno.

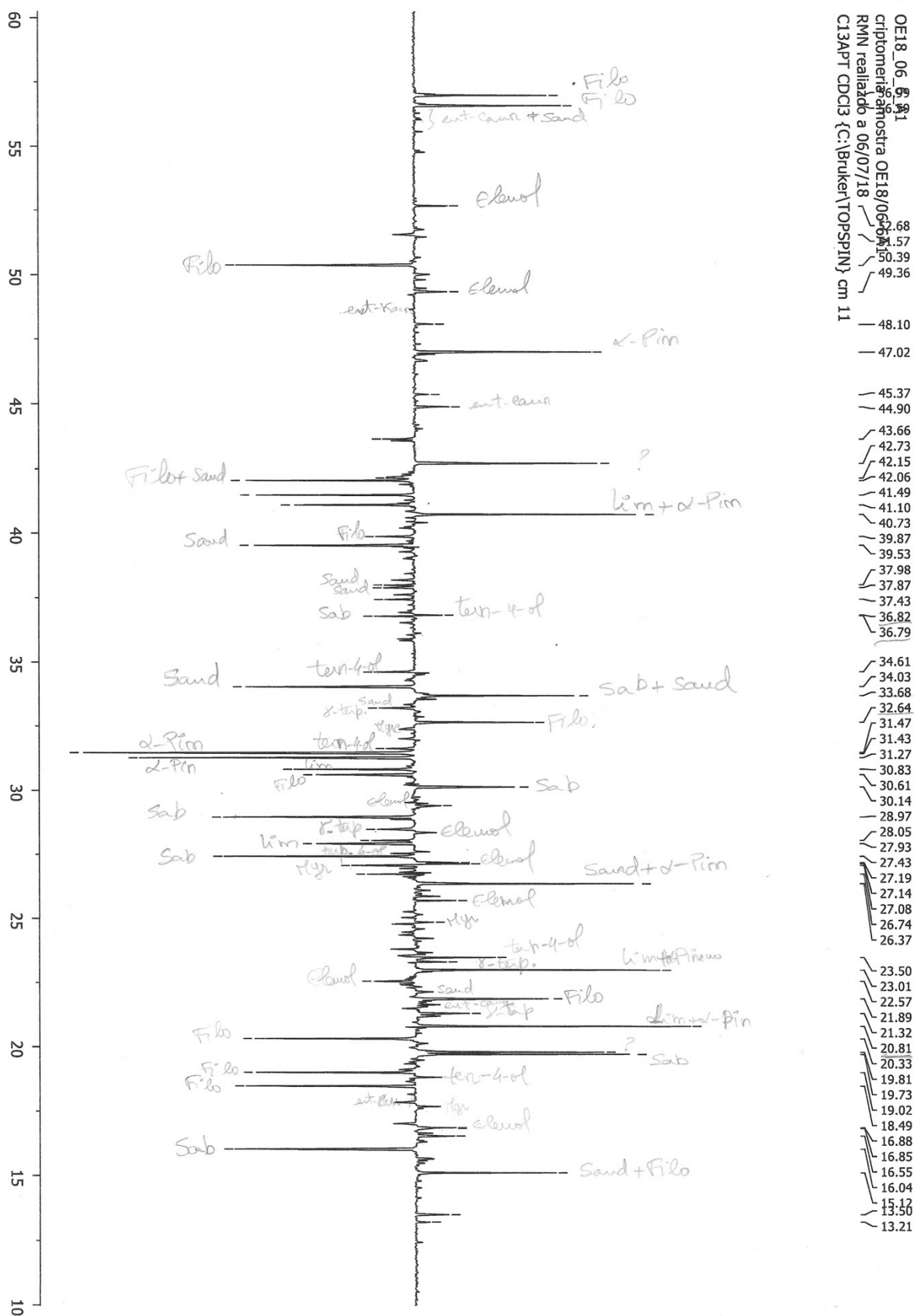


Figura 2- Espectros de ^{13}C RMN (APT) do OE de 18066A1 em CDCl_3 (δ 10 – 60 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: **α -Pin-** α -Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno; **γ -Ter** – γ -Terpineno; **Tern-4-ol**- Terpinen-4-ol; **Emol**- Elemol; **Filo**- Filocladeno; **ent-Caur**- ent-Caureno; **Sand**- Sandacopamaradieno.

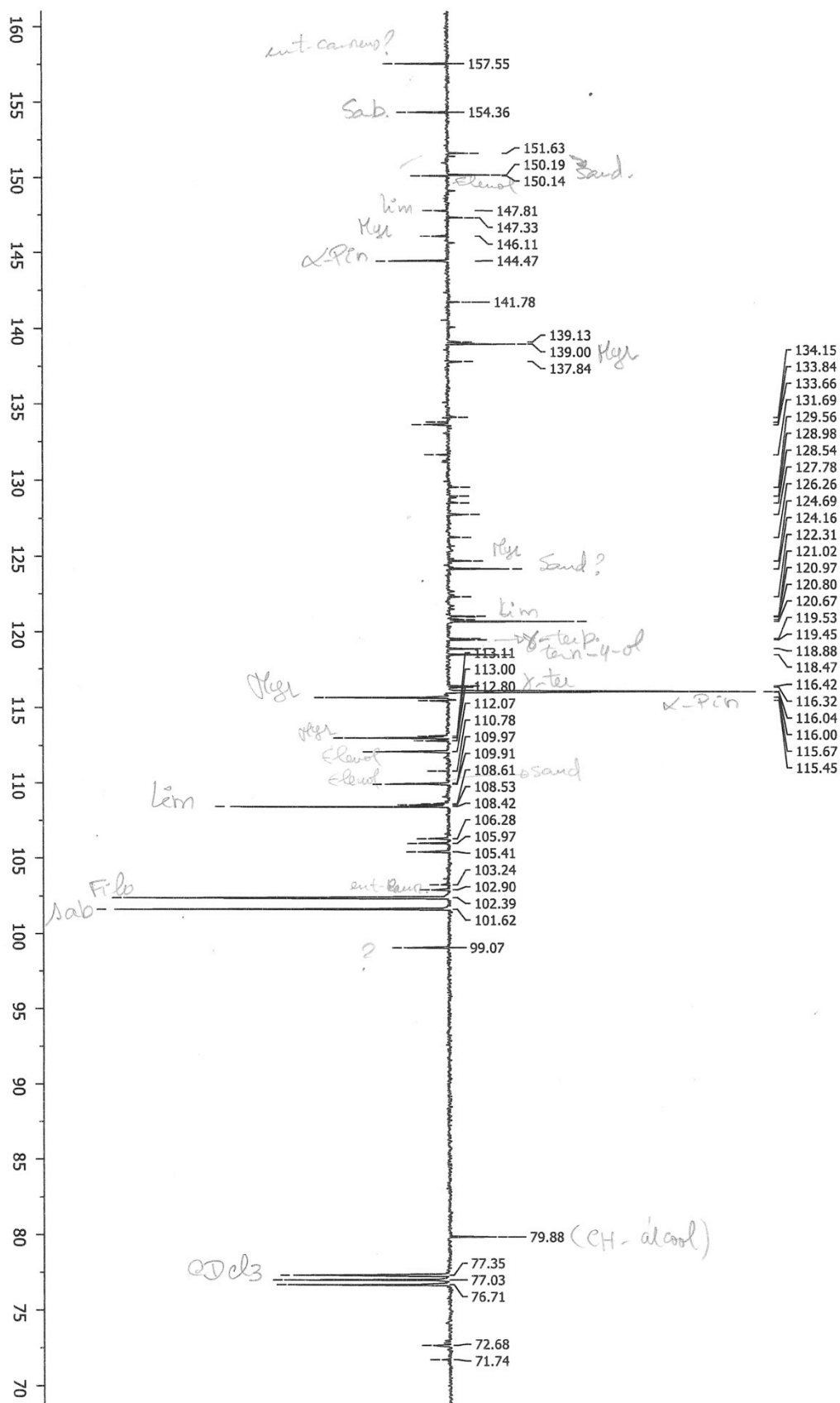


Figura 2.1- Continuação do espectro de ^{13}C RMN (APT) do OE de 18066A1 em CDCl_3 (δ 70 – 160 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: α -Pin- α -Pineno; Sab – Sabineno; Lim – Limoneno; Myr – Mirceno; γ -Ter – γ -Terpineno; Tern-4-ol- Terpinen-4-ol; Emol- Elemol; Filo- Filocladeno; *ent*-Caur- *ent*-Caureno; Sand- Sandacopamaradieno.

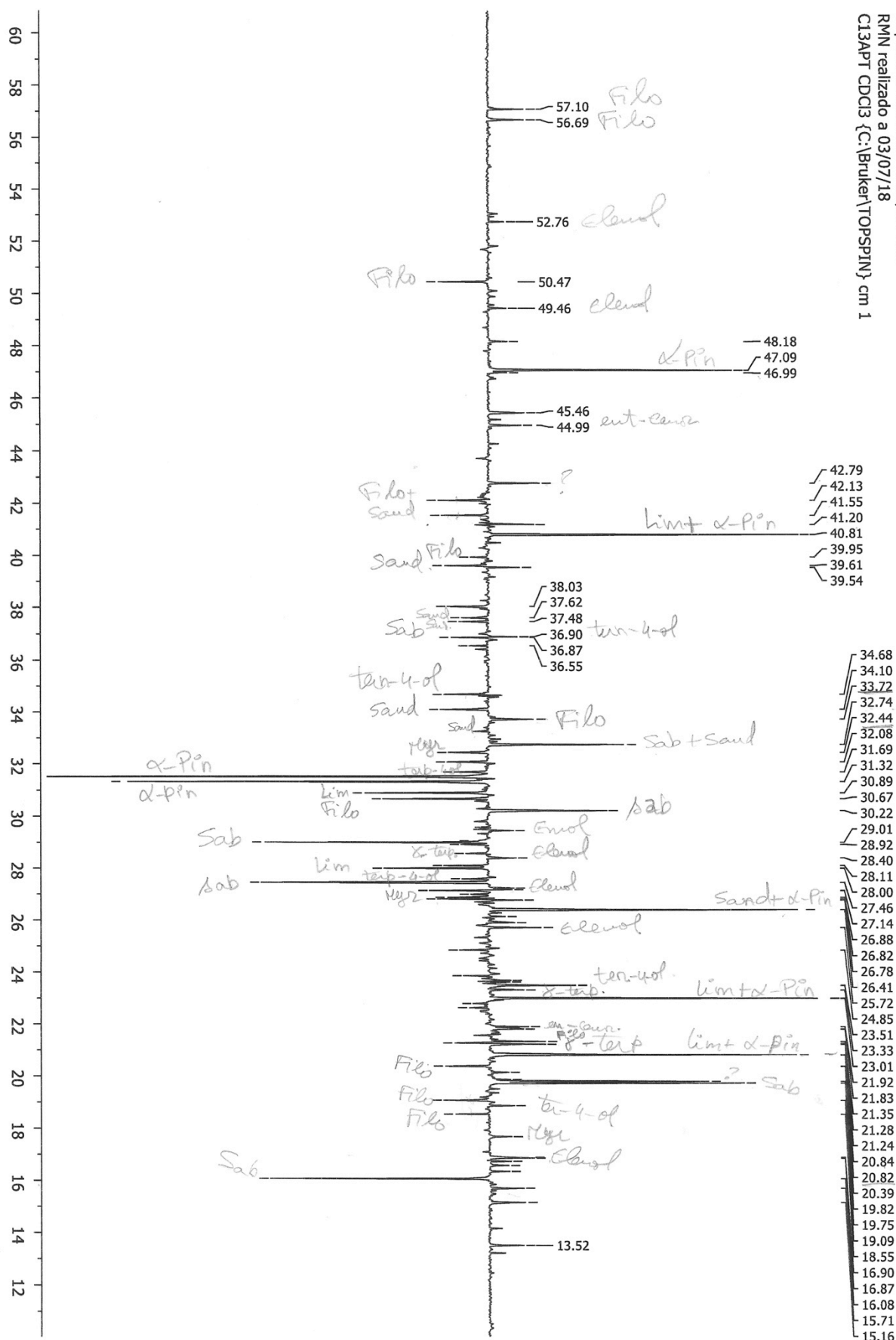


Figura 3- Espectros de ^{13}C RMN (APT) do OE de 18066A2 em CDCl_3 (δ 10 – 60 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: **α -Pin**- α -Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno; **γ -Ter** – γ -Terpineno; **Tern-4-ol**- Terpinen-4-ol; **Emol**- Elemol; **Filo**- Filocladeno; **ent-Caur**- ent-Caureno; **Sand**- Sandacopamaradieno.

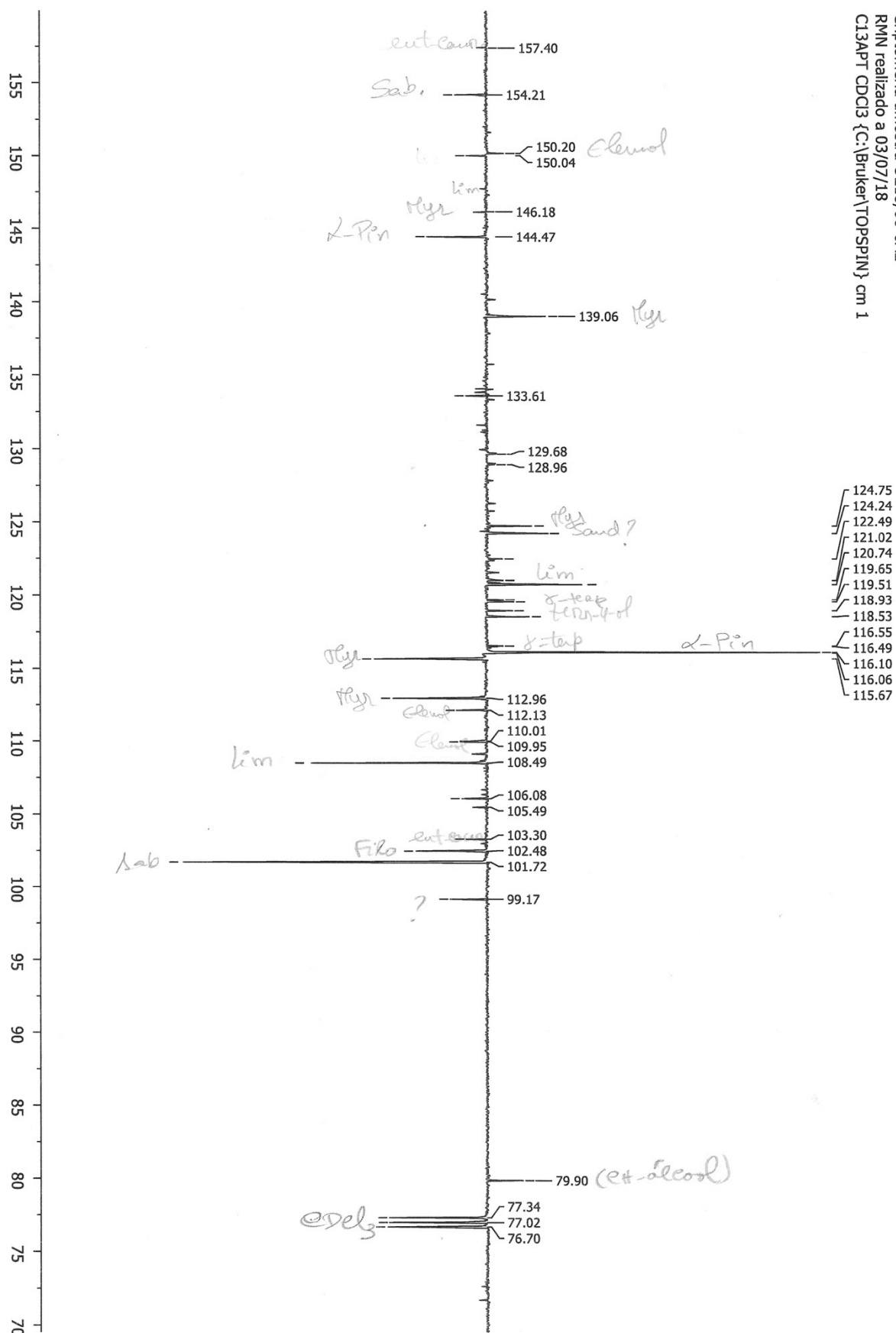


Figura 3.1- Continuação do espectro de ^{13}C RMN (APT) do OE de 18066A2 em CDCl_3 (δ 70 – 160 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: α -Pin- α -Pineno; Sab – Sabineno; Lim – Limoneno; Myr – Mirceno; γ -Ter- γ -Terpineno; Tern-4-ol- Terpinen-4-ol; Emol- Elemol; Filo- Filocladeno; ent-Caur- ent-Caureno; Sand- Sandacopamaradieno.

OE18_06_6_A1
criptomeria amostra OE18/06-6A1
RMN realizado a 06/07/18
C13APT CDC13 {C:\Bruker\TOPSPIN} cm 11
2 2

OE18064A_CDC13_290618
Oleo de criptomeria OE18064A
C13APT CDC13 {C:\Bruker\TOPSPIN} cm 22
1 1

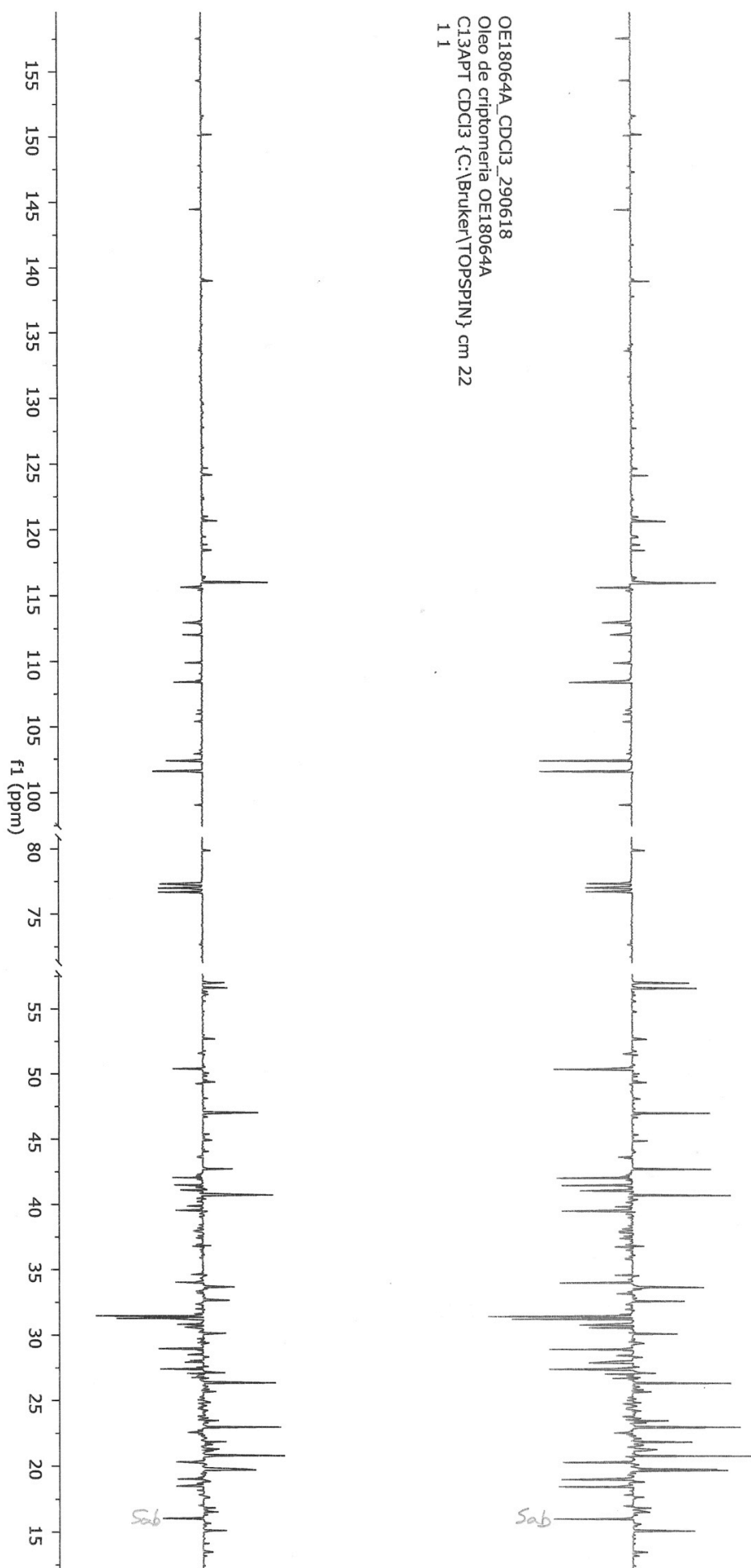


Figura 4- Comparação dos espectros de ^{13}C RMN (APT) dos OEs de 18066A1 e 180664A em CDCl_3 . Identificação dos compostos: α -Pin- α -Pineno; Sab- Sabineno; **Lim**- Limoneno; Myr- Mirceno; γ -Ter- γ -Terpineno; Tern-4-ol-Terpinen-4-ol; Emol- Elemol; Filo- Filocladeno; *ent*-Caur- *ent*-Caureno; Sand- Sandacopamaradieno.

OE18_06_6_A1
criptomeria amostra OE18/06-6A1
RMN realizado a 06/07/18
C13APT CDCI3 {C:\Bruker\TOPSPIN} cm 11

OE18062A_CDCI3_290618
Oleo de criptomeria OE18062A
C13APT CDCI3 {C:\Bruker\TOPSPIN} cm 21

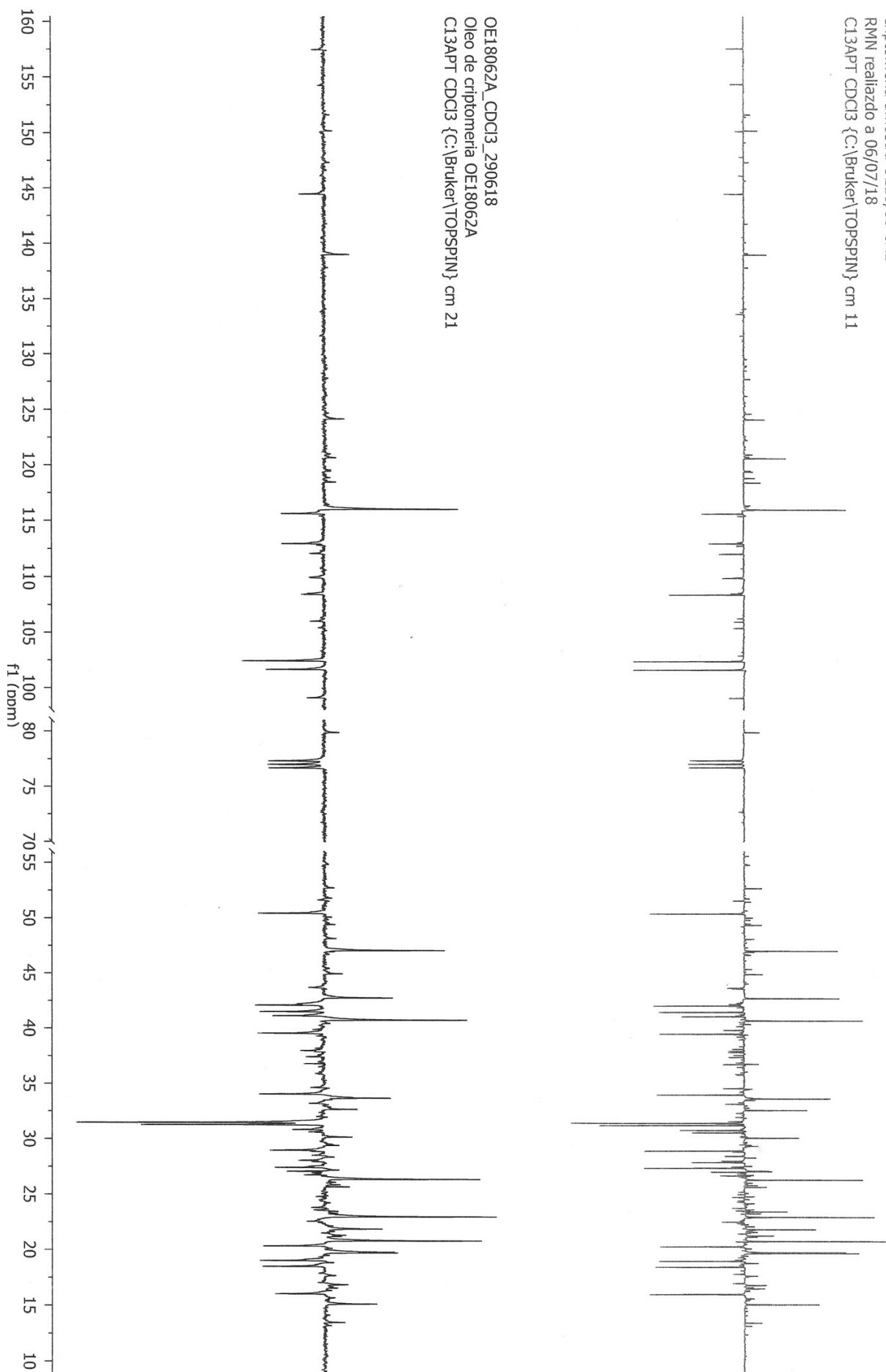


Figura 5- Comparação dos espectros de ^{13}C RMN (APT) dos OEs de 18066A1 e 180662A em CDCl_3 . Identificação dos compostos: α -Pin- α -Pineno; Sab- Sabineno; **Lim**- Limoneno; Myr- Mirceno; γ -Ter- γ -Terpineno; Tern-4-ol-Terpinen-4-ol; Emol- Elemol; Filo- Filocladeno; *ent*-Caur- *ent*-Caureno; Sand- Sandacopamaradieno.

Agradecimentos: ao projeto estratégico do CQB, ref^a UID/MULTI/0062/2013, e ao projeto SAI-AZOR/2018/392.

Analysis by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^{13}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}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^{13}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: Achadinha, Northeast, Azores, Portugal (Woods ca. 50 years); Lomba de São Pedro, Ribeira Grande, São Miguel, Azores, Portugal and Cora da Mata, Ribeirinha Grande, São Miguel, Azores, Portugal (Woods ca. 40 years).

Type of forest: Cultivar

Production Year / production month: 2018 / 06

Quota: 6 (+500m); 4 and 2

Types of soils: Andosols

Part of plant: Aerial parts – tree branches

Extraction procedure: Steam-distillation

Sample: 4 Essential Oils (EOs); **A1; A2; 4A e 2A**

Table 1. Sample codes and extraction condition of *C. japonica* EOs collected in June 2018.

Code (Year; month; quota; soil type; sample number)	Plant processing	Distillation time (h:min)	Yield (%, v/w)
18066A1	Uncut branches	2:00	0.19
18066A2	Cut branches	2:00	0.25
18064A	Uncut branches	2:00	0.21
18062A	Uncut branches	2:05	0.18

The four samples of EOs, representative of June 2018 provided by Azorina S.A., were analyzed by the ^{13}C NMR technique simultaneously with the GC and GC-MS analyzes. Thus, following the same procedure used for May samples, a comparative analysis of the chemical composition of the four EOs (A1; A2; 4A and 2A) was proceeded.

Regarding the extraction yields of the EOs, a variation is observed independently of the extraction time and origin (quota and collection region), as shown in table 1. Additionally, the yields of EOs from June were lower than those of May. Samples of tree branches cut or uncut collected in the same quota and place (Achadinha, Northeast, Azores, Portugal) afforded different extraction yields. Thus, the uncut branches present an extraction yield of EO (18066A1) slightly lower than the EO (18066A2) from the cut branches. This variation yet occurred with the same samples of May 2018.

The ^{13}C RMN chemical profiles of EOs 18066A1 and 18066A2 (same quote and region) is similar being the chemical composition of EO 18066A2, from cut branches, poorer than EO 18066A1, from uncut branches (Figure 1), as previously verified with the samples of May 2018. The comparative analysis of these two cryptomeria EOs with the spectra of the pure oil components, is characterized by high contents of monoterpene hydrocarbons, such as α -pinene and sabinene, which correspond to *ca.* 50% of the total oil percentage. Other volatile compounds as myrcene, limonene and α -terpinene with low content were also detected followed of the oxygenated compounds such as terpinen-4-ol and elemol, among others were also identified but in low contents (Figures 2, 2.1, 3 and 3.1). Diterpenes type phyllocladene, *ent*-kaurene and sandacopamaradiene were also detected, as compared with EOs of the previous month. It should be noted that, in EO (18066A2), from cut branches, the content of diterpenes such as phyllocladene and sandacopamaradiene was decayed, while α -pinene and sabinene monoterpenes a slight increase was observed (Figures 1, 3 and 3.1).

The EOs, 18066A1 and 18064A, from uncut branches of different quotes and regions have similares ^{13}C NMR chemical profiles (Figure 4). Monoterpenes, such as α -pinene and sabinene (*ca.* de 50%) are the main constituents of both EOs while myrcene, limonene, α -terpinene, terpinen-4-ol, elemol and a fraction of diterpenes, phyllocladene, *ent*-kaurene and sandacopamaradiene, are present as minor constituents.

The EO 18062A from non-processed branches (Cora da Mata, Ribeirinha Grande, São Miguel, Azores; woods *ca.* 40 years and quote 2) distinguishes considerably from others EOs. This EO is characterized by high contents of α -pinene and sabinene, with an increase of the first and decrease of the last. Other constituents, such as limonene, elemol and the fraction of diterpenes appear in minor percentages, with *ent*-kaurene being not detected (Figure 5).

OE18_06_6_A1
criptomeria amostra OE18/06-6A1
RMN realizado a 06/07/18
C13APT CDCl3 {C:\Bruker\TOPSPIN} cm 11

OE_18_06_6_A2
Criptomera amostra OE18/06-6A2
RMN realizado a 03/07/18
C13APT CDCl3 {C:\Bruker\TOPSPIN} cm 1

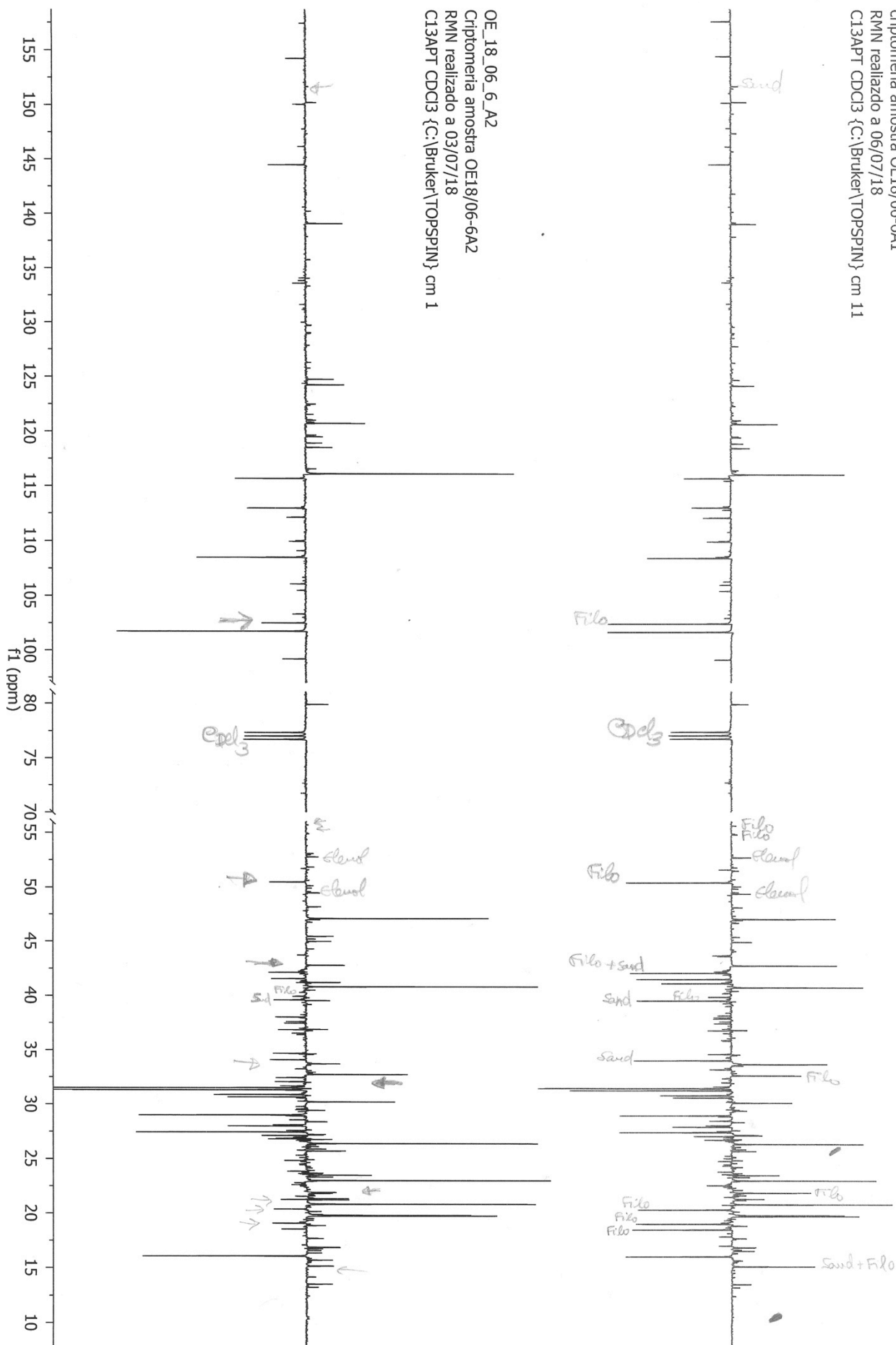


Figure 1. ^{13}C NMR (APT) spectra comparison of EOs 18066A1 and 18066A2 in CDCl_3 (δ 10 – 160 ppm). (Reference Tetramethylsilane – TMS). Acquisition in 400 MHz NMR.

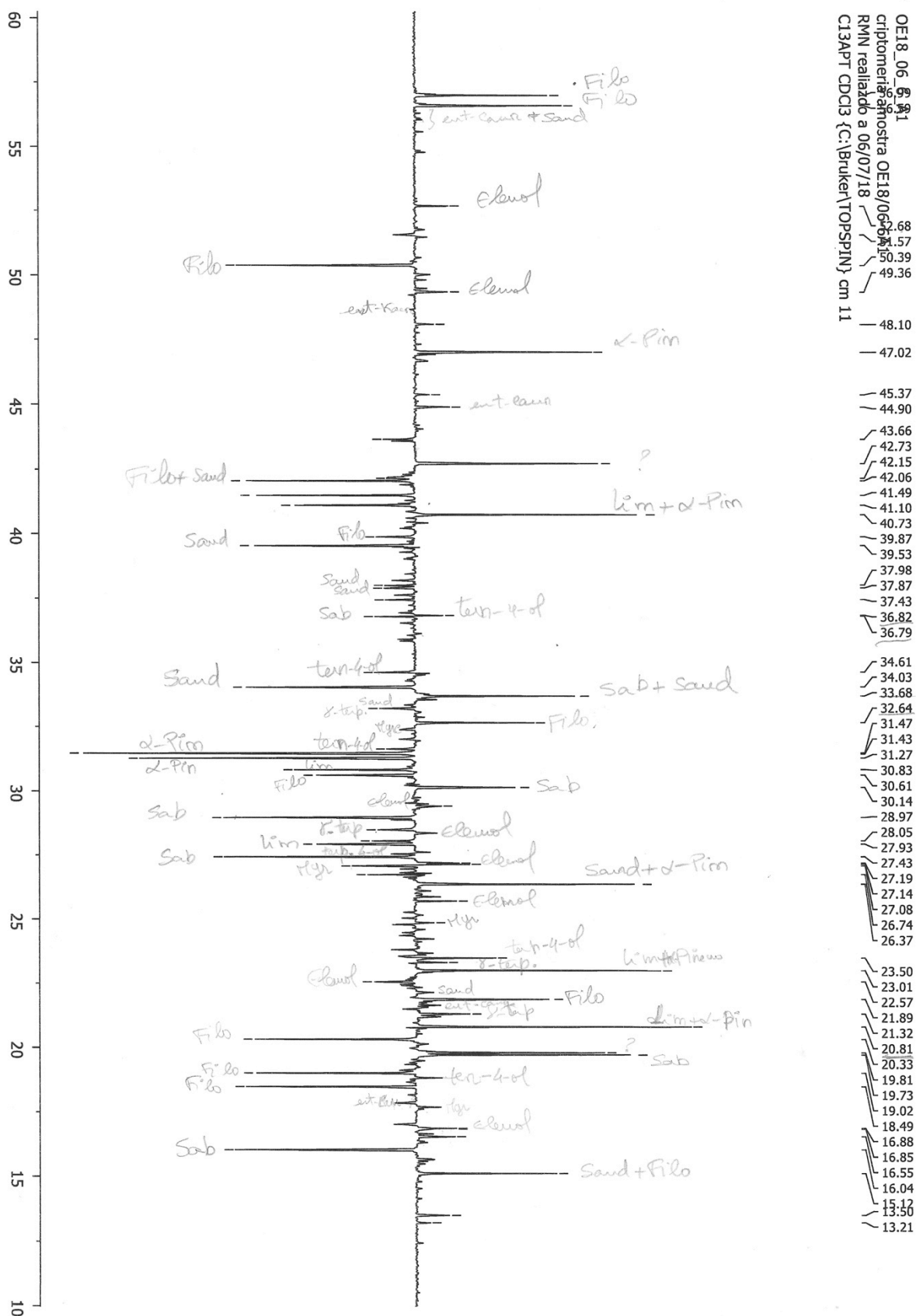


Figure 2. ^{13}C NMR (APT) spectrum of EO 18066A1 in CDCl_3 (δ 10 – 60 ppm). Name of compounds: **α -Pin**- α -Pinene; **Sab** – Sabinene; **Lim** – Limonene; **Myr** – Myrcene; **γ -Ter** – γ -Terpinene; **Tern-4-ol**- Terpinen-4-ol; **Emol**- Elemol; **Filo**- Phyllocladene; **ent-Kaur**- ent-Kaureno; **Sand**- Sandacopamarine.

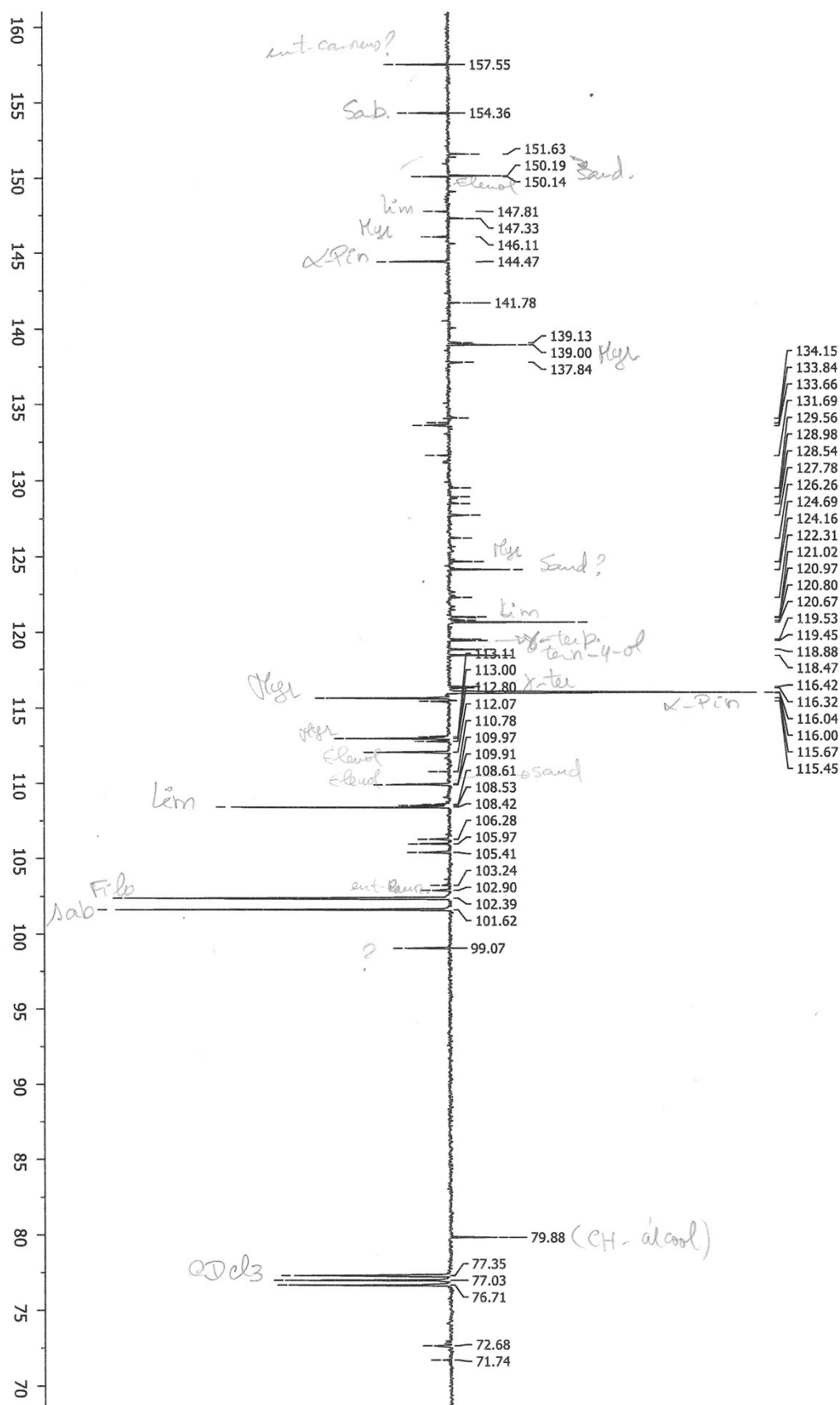


Figure 2.1- ^{13}C NMR (APT) spectrum of EO 18066A1 in CDCl_3 (δ 70 - 160 ppm). Name of compounds: α -Pin- α -Pinene; Sab - Sabinene; Lim - Limonene; Myr - Myrcene; γ -Ter - γ -Terpinene; Tern-4-ol- Terpinen-4-ol; Emol- Elemol; Filo- Phyllocladene; *ent*-Kaur- *ent*-Kaureno; Sand- Sandacopamarine.

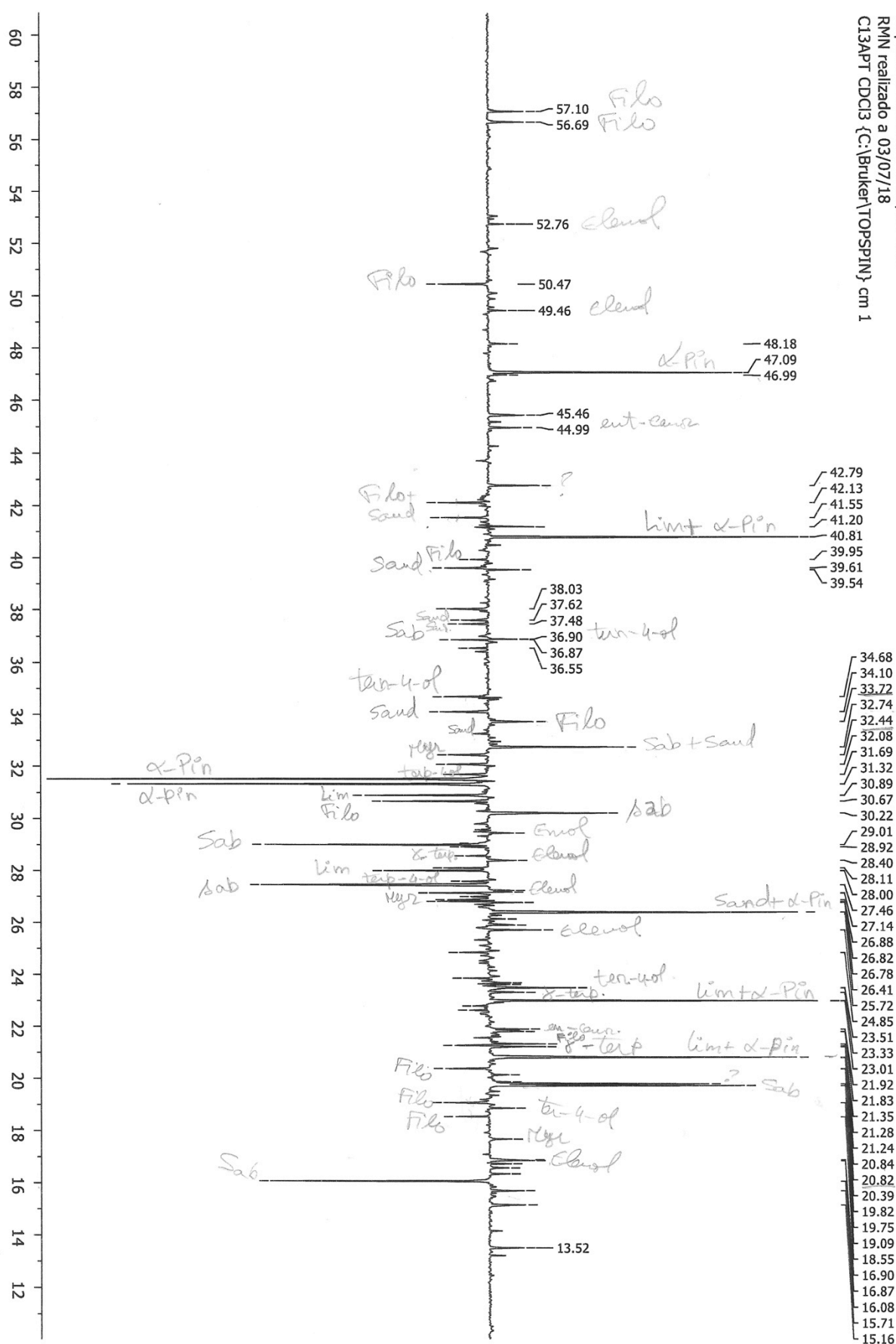


Figure 3. ^{13}C NMR (APT) spectrum of EO 18066A2 in CDCl_3 (δ 10 – 60 ppm). Name of compounds: α -Pin- α -Pinene; Sab- Sabinene; Lim- Limonene; Myr- Myrcene; γ -Ter - γ -Terpinene; Tern-4-ol- Terpinen-4-ol; Emol- Elemol; Filo- Phyllocladene; ent-Kaur- ent-Kaureno; Sand- Sandacopamarine.

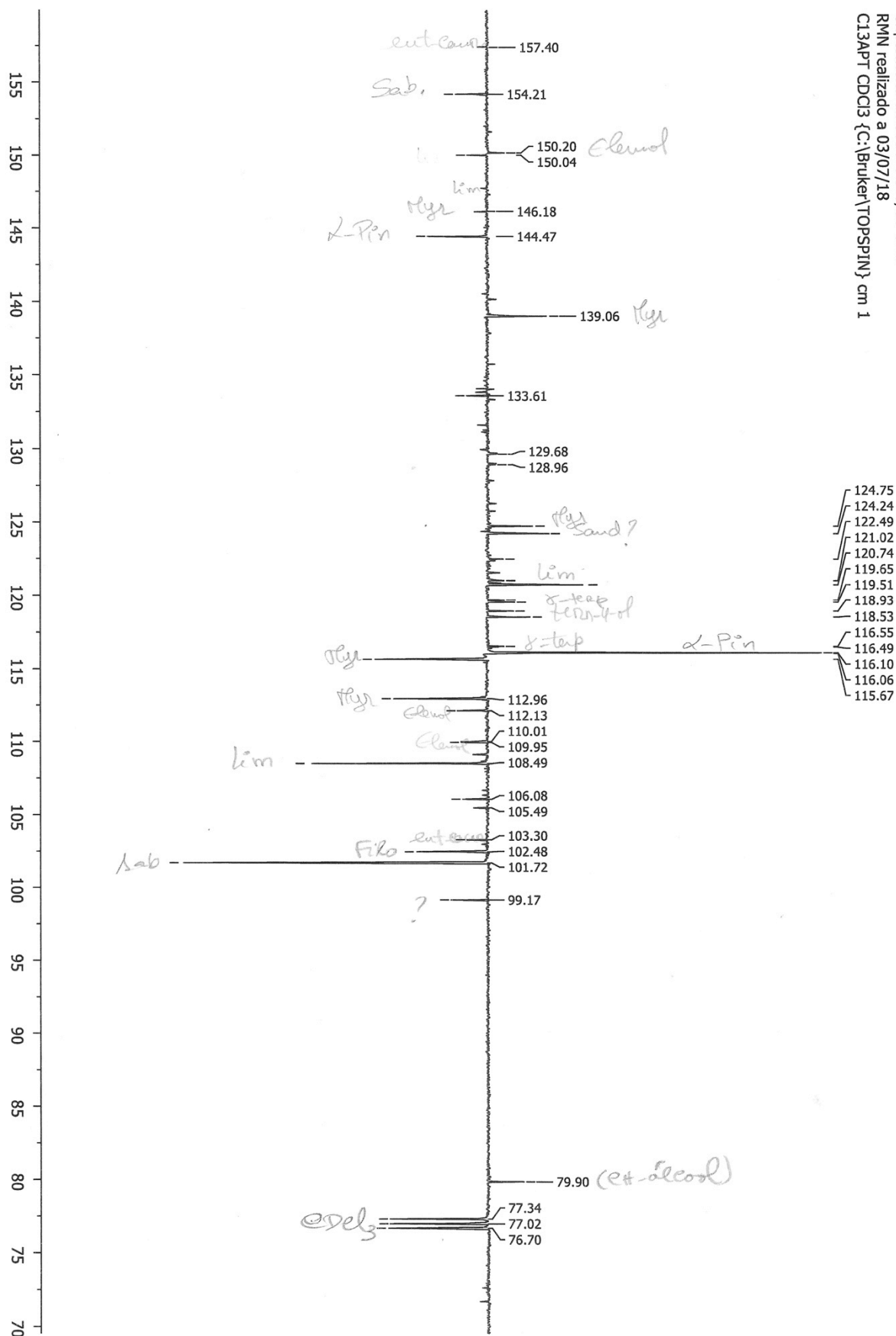


Figure 3.1. ¹³C NMR (APT) spectrum of EO 18066A2 in CDCl₃ (δ 70 – 160 ppm). Name of compounds: α-Pin- α-Pinene; Sab – Sabinene; Lim – Limonene; Myr – Myrcene; γ-Ter – γ-Terpinene; Tern-4-ol- Terpinen-4-ol; Emol- Elemol; Filo- Phyllocladene; ent-Kaur- ent-Kaureno; Sand- Sandacopamarine.

OE18_06_6_A1
criptomeria amostra OE18/06-6A1
RMN realizado a 06/07/18
C13APT CDCl3 {C:\Bruker\TOPSPIN} cm 11
2 2

OE18064A_CDCl3_290618
Oleo de criptomeria OE18064A
C13APT CDCl3 {C:\Bruker\TOPSPIN} cm 22
1 1

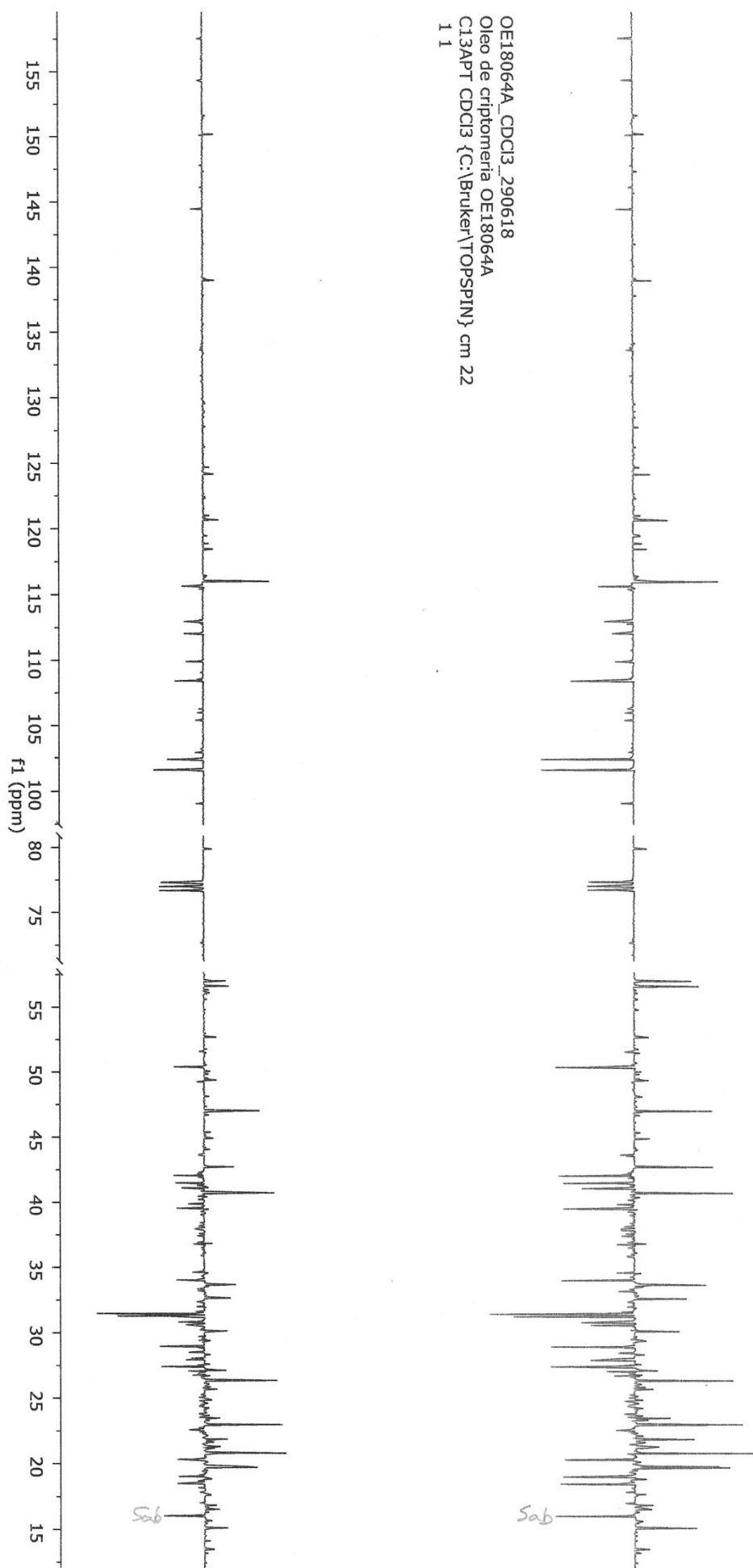


Figure 4. ^{13}C NMR (APT) spectra comparison of EOs 18066A1 and 180664A in CDCl_3 (δ 10 – 160 ppm). Name of compounds: α -Pin- α -Pinene; Sab – Sabinene; Lim – Limonene; Myr – Myrcene; γ -Ter – γ -Terpinene; Tern-4-ol- Terpinen-4-ol; Emol- Elemol; Filo-Phyllocladene; ent-Kaur- ent-Kaureno; Sand- Sandacopamarine.

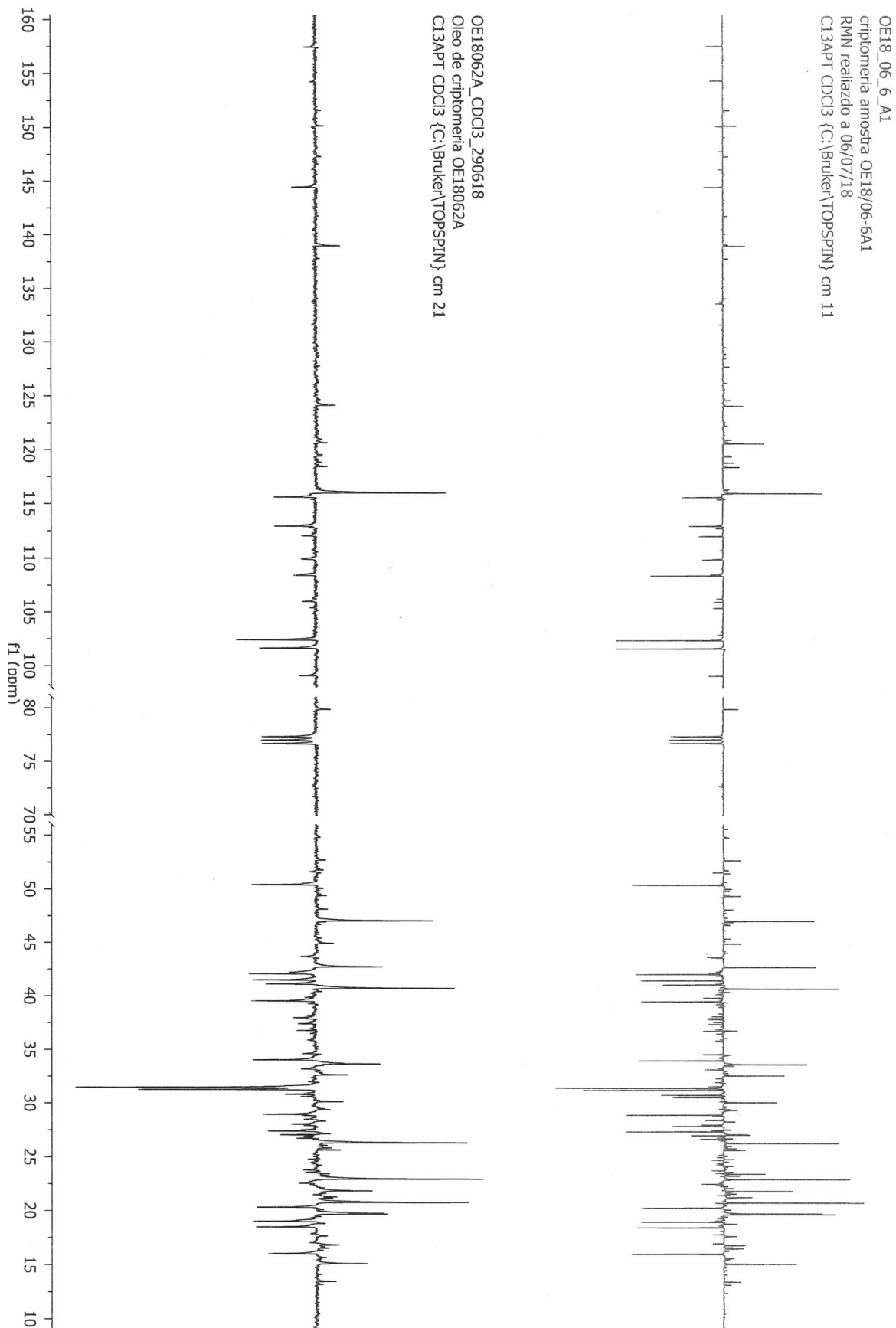


Figure 5. ^{13}C NMR (APT) spectra comparison of EOs 18066A1 and 180662A in CDCl_3 (δ 10 – 160 ppm). Name of compounds: α -Pin- α -Pinene; Sab – Sabinene; Lim – Limonene; Myr – Myrcene; γ -Ter – γ -Terpinene; Tern-4-ol- Terpinen-4-ol; Emol- Elemol; Filo-Phyllocladene; *ent*-Kaur- *ent*-Kaureno; Sand- Sandacopamarine.

Acknowledgments: Thanks are due to CQB, ref^a UID/MULTI/0062/2013, and to project SAI-AZOR/2018/392.