

Relatório no âmbito do projeto

Report on project

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

Setembro, 2018

September, 2018



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.....	5
Análise de óleo essencial / Essential oil analysis - <i>Cryptomeria japonica</i> (Thunb. ex L.f.) D.Don.....	5
Análise por Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)	5
Analysis by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS).....	5
 CQB	 9
Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (^{13}C RMN)	9
Analysis by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^{13}C NMR)	15

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	Agosto de 2018 / August 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 Agosto de 2018.

Table 1. Data on *Cryptomeria japonica* essential oils samples, isolated in August 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	0.28	18086A1
Ramadas e bicadas	Lote estilhado (2h:37min)	Branches from landscaping	Woodchips (2h:37min)	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	2:00	0.33	18086A2
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Coroa da Mata, Ribeirinha, Ribera Grande, São Miguel, Açores	2:00	0.17	18082 ^A

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

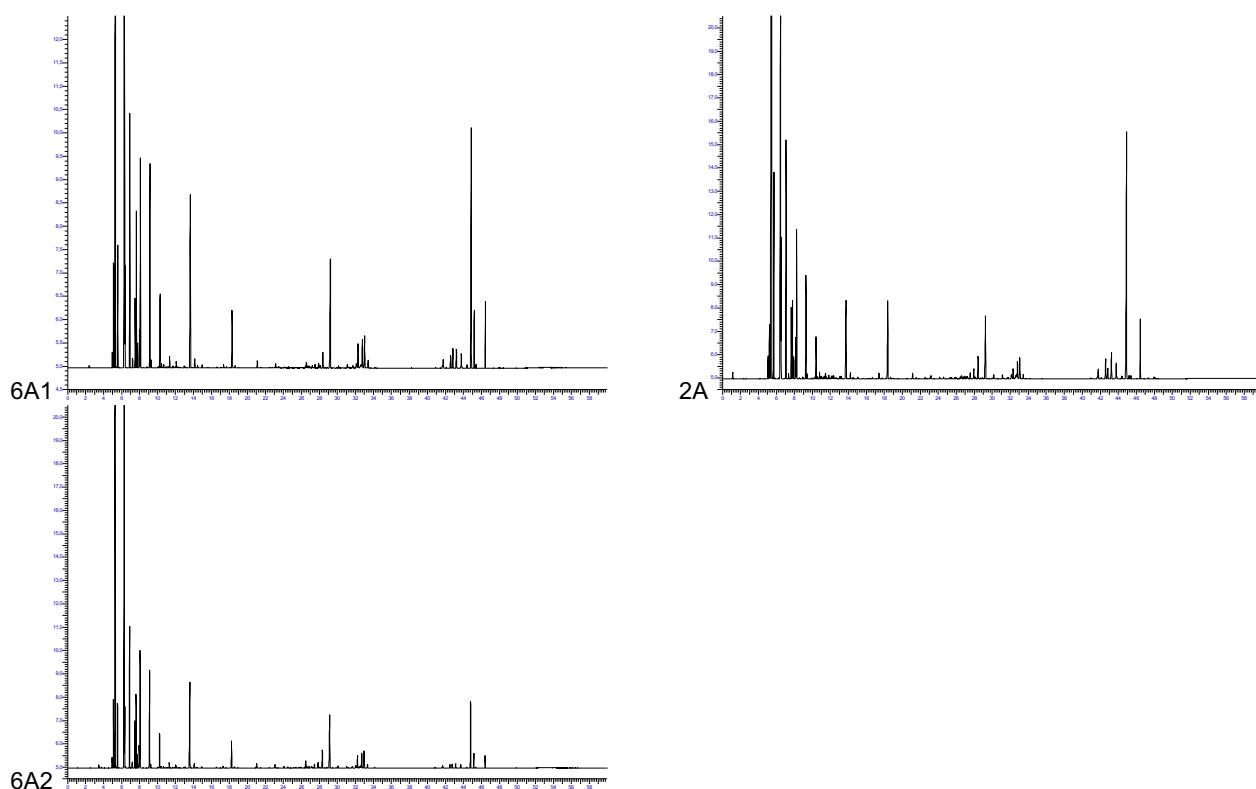


Fig. 1. Perfis cromatográficos das amostras analisadas. / **Fig. 1.** Gas chromatography profiles, taken on the DB-1 column, of the essential oils isolated from *Cryptomeria japonica* samples (for sample codes, see Table 1).

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

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

Componentes	Components	IR / RI	18086A1	18086A2	18082A
Triciclano	Tricyclene	921	0.2	0.2	0.4
α -Tujeno	α -Thujene	924	1.8	2.3	1.5
α -Pineno	α -Pinene	930	23.9	29.7	36.5
Canfeno	Camphene	938	2.0	2.0	3.6
Sabineno	Sabinene	958	22.4	24.4	15.1
β -Pineno	β -Pinene	963	2.2	2.4	1.5
β -Mirceno	β -Myrcene	975	4.5	4.9	5.4
α -Felandreno	α -Phellandrene	995	0.2	0.2	0.1
δ -3-Careno	δ -3-Carene	1000	1.2	1.5	1.5
α -Terpineno	α -Terpinene	1002	2.8	2.4	1.5
<i>p</i> -Cimeno	<i>p</i> -Cymene	1003	0.4	0.5	0.4
β -Felandreno	β -Phellandrene	1005	0.7	0.8	0.9
Limoneno	Limonene	1009	3.9	4.3	3.5
<i>cis</i> - β -Ocimeno	<i>cis</i> - β -Ocimene	1017	t	t	t
<i>trans</i> - β -Ocimeno	<i>trans</i> - β -Ocimene	1027	t	t	t
γ -Terpineno	γ -Terpinene	1035	4.4	3.7	2.4
Hidrato de <i>trans</i> -sabineno	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1037	0.2	0.1	0.1
2,5-Dimetil estireno	2,5-Dimethyl styrene	1059	t	t	t
Terpinoleno	Terpinolene	1064	1.5	1.3	1.0
Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1066	0.1	t	t
Linalol	Linalool	1074	t	t	0.2
Acetato de 1-octen-3-ilo	1-Octen-3-yl acetate	1086	t	t	t
<i>trans</i> - <i>p</i> -2-Menten-1-ol	<i>trans</i> - <i>p</i> -2-Menthen-1-ol	1099	0.3	0.2	0.1
Cânfora	Camphor	1102	0.1	0.1	0.1
<i>cis</i> - <i>p</i> -2-Menten-1-ol	<i>cis</i> - <i>p</i> -2-Menthen-1-ol	1114	t	t	0.1
Borneol	Borneol	1134	t	t	T
Terpinen-4-ol	Terpinen-4-ol	1148	5.5	4.8	2.7
α -Terpineol	α -Terpineol	1159	0.2	t	0.2
Acetato de α -fenchilo	α -Fenchyl acetate	1200	t	t	t
Acetato de linalilo	Linalyl acetate	1245	0.1	t	0.2
Acetato de bornilo	Bornyl acetate	1265	1.5	1.3	2.4
Acetato de α -terpenilo	α -Terpenyl acetate	1334	0.2	0.2	0.2
α -Cubebeno	α -Cubebene	1345	0.1	0.1	0.1
α -Copaeno	α -Copaene	1375	t	t	t
β -Bourboneno	β -Bourbonene	1379	t	t	t
β -Elemeno	β -Elemene	1388	t	t	t
β -Cariofileno	β -Caryophyllene	1414	t	t	t
β -Copaeno	β -Copaene	1426	t	t	t
α -Humuleno	α -Humulene	1447	t	t	t
γ -Muuroleno	γ -Muurolene	1469	t	t	t
Germacreno D	Germacrene D	1474	0.2	0.5	0.1
Biciclogermacreno	Bicyclogermacrene	1487	0.1	0.2	0.1
α -Muuroleno	α -Muurolene	1494	0.1	0.2	0.2
γ -Cadineno	γ -Cadinene	1500	0.2	0.3	0.3
<i>trans</i> -Calameneno	<i>trans</i> -Calamenene	1505	0.1	t	t
δ -Cadineno	δ -Cadinene	1505	0.4	0.9	0.6
Elemol	Elemol	1530	3.9	3.2	2.2
Germacreno D-4-ol *	Germacrene D-4-ol *	1557	t	0.1	0.1
Óxido de β -cariofileno	β -Caryophyllene oxide	1561	0.1	t	t
Anidrooplopanona	Anhydrooplopanone	1576	t	t	t
γ -Eudesmol	γ -Eudesmol	1609	0.7	0.6	0.3
T-Cadinol	T-Cadinol	1616	0.1	0.1	0.1
T-Muurolol	T-Muurolol	1616	t	t	0.1
β -Eudesmol	β -Eudesmol	1620	0.9	0.8	0.6
α -Eudesmol	α -Eudesmol	1634	1.1	0.9	0.8
Criptomeriona*	Cryptomerione*	1686	t	t	t

Componentes	Components	IR / RI	18086A1	18086A2	18082A
Rimueno	Rimueene	1814	t	t	t
Isopimara-9(11),15-dieno	Isopimara-9(11),15-diene	1821	0.3	0.1	0.4
NI 1	UI 1	1915	0.4	0.2	0.6
NI 2	UI 2	1915	0.6	0.2	0.4
NI 3	UI 3	1924	0.6	0.3	0.8
Sandaracopimara-8(14),15-dieno	Sandaracopimara-8(14),15-diene	1956	0.5	0.2	0.5
Filocladeno*	Phyllocladene	2006	6.4	2.6	8.6
Caureno	Kaurene	2044	1.2	0.5	t
Abietadieno	Abietadiene	2060	t	t	t
NI 4	UI 4	2176	1.1	0.3	1.0
% Identificação	% identification		96.7	98.6	96.7
Componentes agrupados	Grouped components				
Hidrocarbonetos monoterpénicos	Monoterpene hydrocarbons		72.1	80.6	75.3
Monoterpenos oxigenados	Oxygen-containing monoterpenes		8.2	6.7	6.3
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	Sesquiterpene hydrocarbons		1.2	2.2	1.4
Sesquiterpenos oxigenados	Oxygen-containing sesquiterpenes		6.8	5.7	4.2
Hidrocarbonetos diterpénicos	Diterpene hydrocarbons		8.4	3.4	9.5
Outros	Others		t	t	t

IR – Índices de retenção calculados relativamente a uma série de *n*-alcanos C₉-C₂₂ 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 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) e Cora da Mata, Ribeirinha Grande, São Miguel, Açores, Portugal (Mata ca. 40 anos).

Tipo de mata: Cultivo

Ano / mês de recolha: 2018 / 08

Cota: 6 e 2

Tipo de solo: Andossolo (A)

Parte da planta: parte aérea – ramadas e bicadas (RB)

Método de extração: Destilação por arrastamento de vapor

Amostra: 3 óleos essenciais (OEs); **A1**; **A2** e **2A**

Tabela 1. Código das amostras recebidas em agosto 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)
18086A1	Amostra não estilhada	2:00	0,28
18086A2	Amostra estilhada	2:00	0,33
18082A	Amostra não estilhada	2:00	0,17

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

O perfil químico de ^{13}C RMN dos OEs do mês de agosto, 18086**A1** e 18086**A2**, de ramas e bicadas do mesmo local e mesma cota, são semelhantes. No OE 18086A2, obtido da planta estilhada comparativamente com o OE 18086A1 da planta não estilhada, observa-se um aumento de monoterpenos, sabineno, α -pineno e limoneno, os quais constituem 50% da percentagem total do OE e uma diminuição dos diterpenos, sandaracopamaradieno, filocladeno e *ent*-caureno (Anexo, Figura 1).

O OE 18086**A1**, da planta não estilhada, resultante do mês de agosto está menos enriquecido em α -pineno, limoneno, mirceno, elemol, filocladeno e *ent*-caureno, e mais enriquecido em terpinen-4-ol quando comparado com o OE do mês de julho (18076**A1**) (Anexo, Figura 2).

O OE 18086**A2** (ramadas e bicadas estilhadas) do mês de agosto apresenta os mesmos constituintes que o OE do mês de julho (18076**A2**), mas com um aumento nas percentagens de α -pineno, sabineno e γ -terpinen-

4-ol (Anexo, Figura 3).

O OE 18082A do mês de agosto resultante de amostras de ramadas e bicadas não estilhadas (da Cora da Mata, Ribeirinha Grande, São Miguel e mata ca. 40 anos e cota 2) apresenta variações na percentagem dos constituintes comparativamente com o mês anterior (OE 18072A). No OE do mês de agosto (18082A) deteta-se um ligeiro aumento de α -pineno e diminuição de sabineno, limoneno e filocladeno (Anexo, Figura 4).

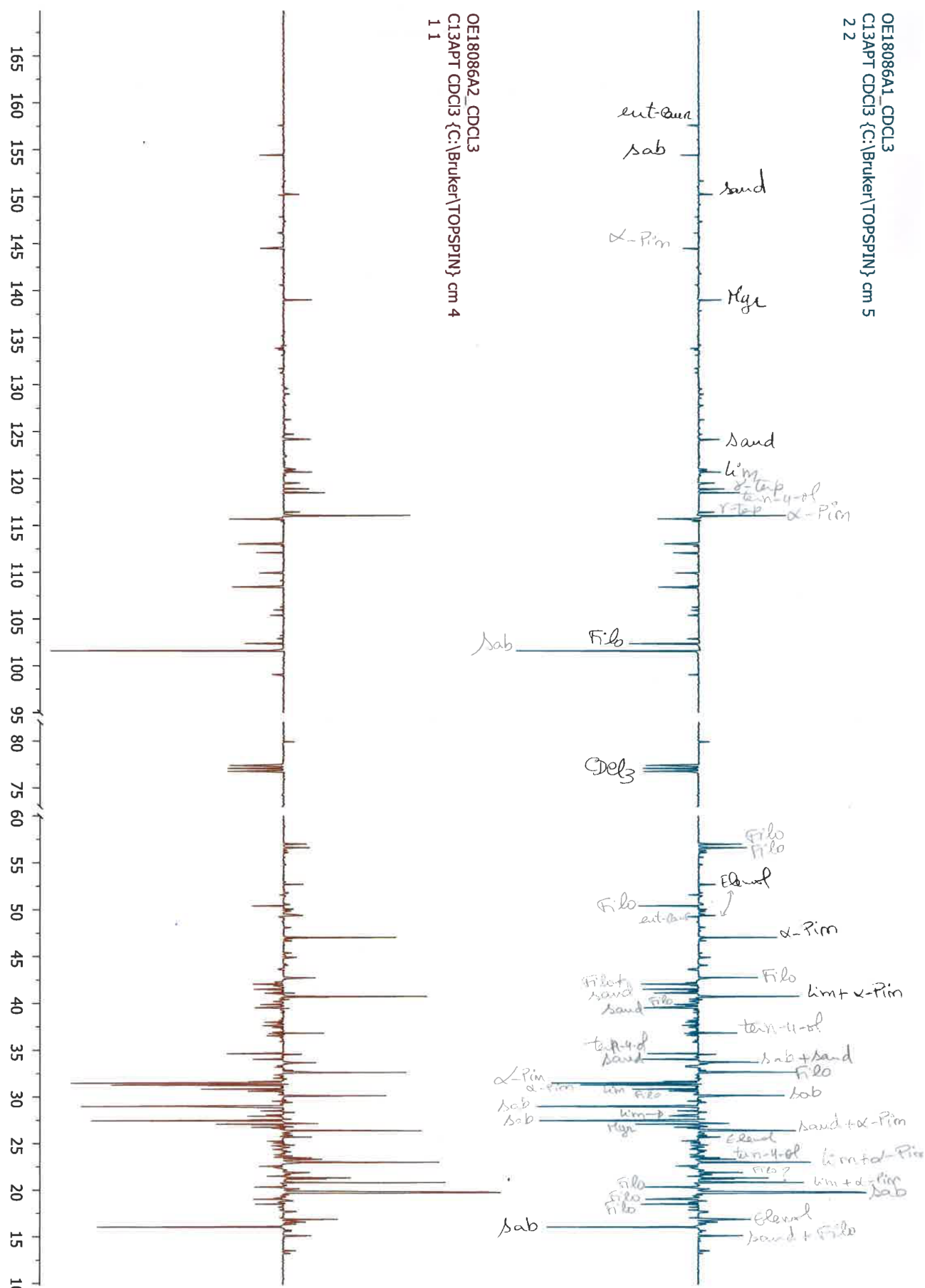


Figura 1. Comparação dos espectros de ^{13}C RMN (APT) dos OEs de 18086A1 e 18086A2 em CDCl_3 (δ 10 – 170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: **α -Pin**- α -Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno; **γ -Ter** – γ -Terpineno; **Tern-4-ol**- Terpinen-4-ol; **Emol**- Elemol; **Filo**- Filocladeno; **ent-Caur**- ent-Caureno; **Sand**- Sandaracopamaradieno.

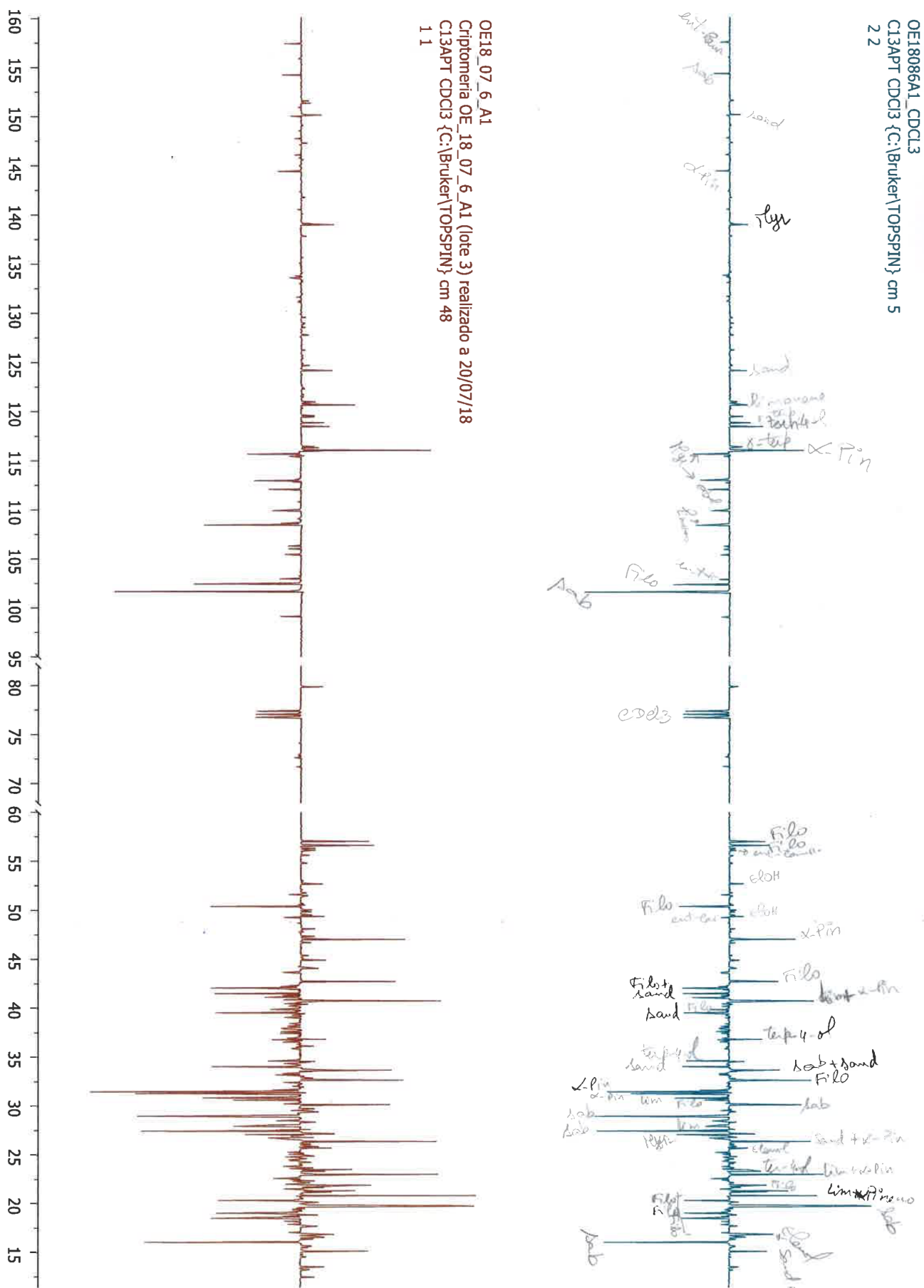


Figura 2- Comparação dos espectros de ^{13}C RMN (APT) do OE de 18086A1 (verde) e 18076A1 (castanho) em CDCl_3 (δ 10 –170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: **α -Pin-** α -Pinenó; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno; **γ -Ter** – γ -Terpineno; **Tern-4-ol**- Terpinen-4-ol; **Emol**- Elemol; **Fillo**- Filocladeno; **ent-Caur**- ent-Caureno; **Sand**- Sandaracopamaradieno.

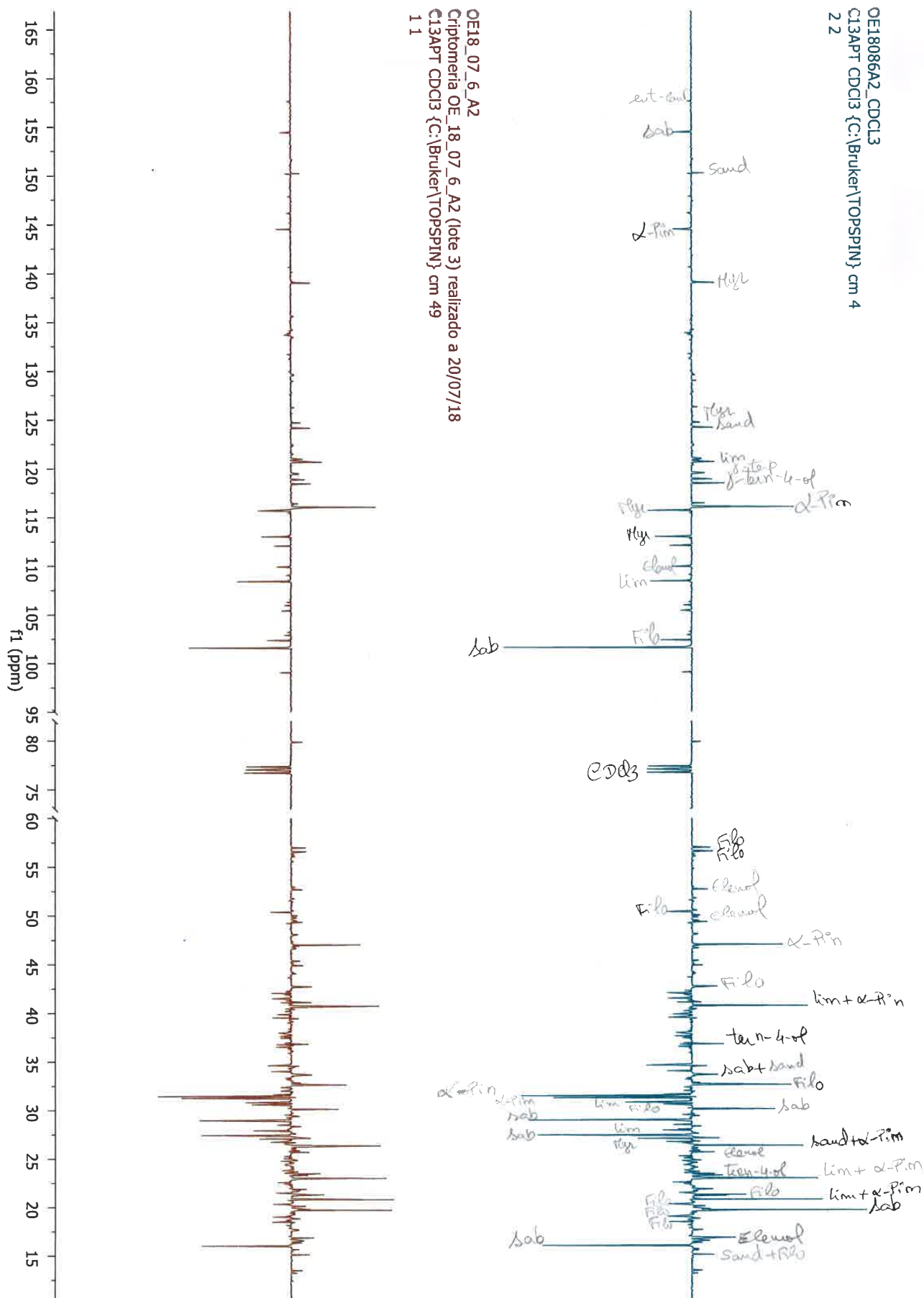


Figura 3- Comparação dos espectros de ^{13}C RMN (APT) do OE de 18086A2 (verde) e 18076A2 (castanho) em CDCl_3 (δ 70 – 170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: **α -Pin-** α -Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno; **γ -Ter** – γ -Terpineno; **Tern-4-ol**- Terpinen-4-ol; **Emol**- Elemol; **Filo**- Filocladeno; **ent-Caur-** ent-Caureno; **Sand**- Sandaracopamaradieno.

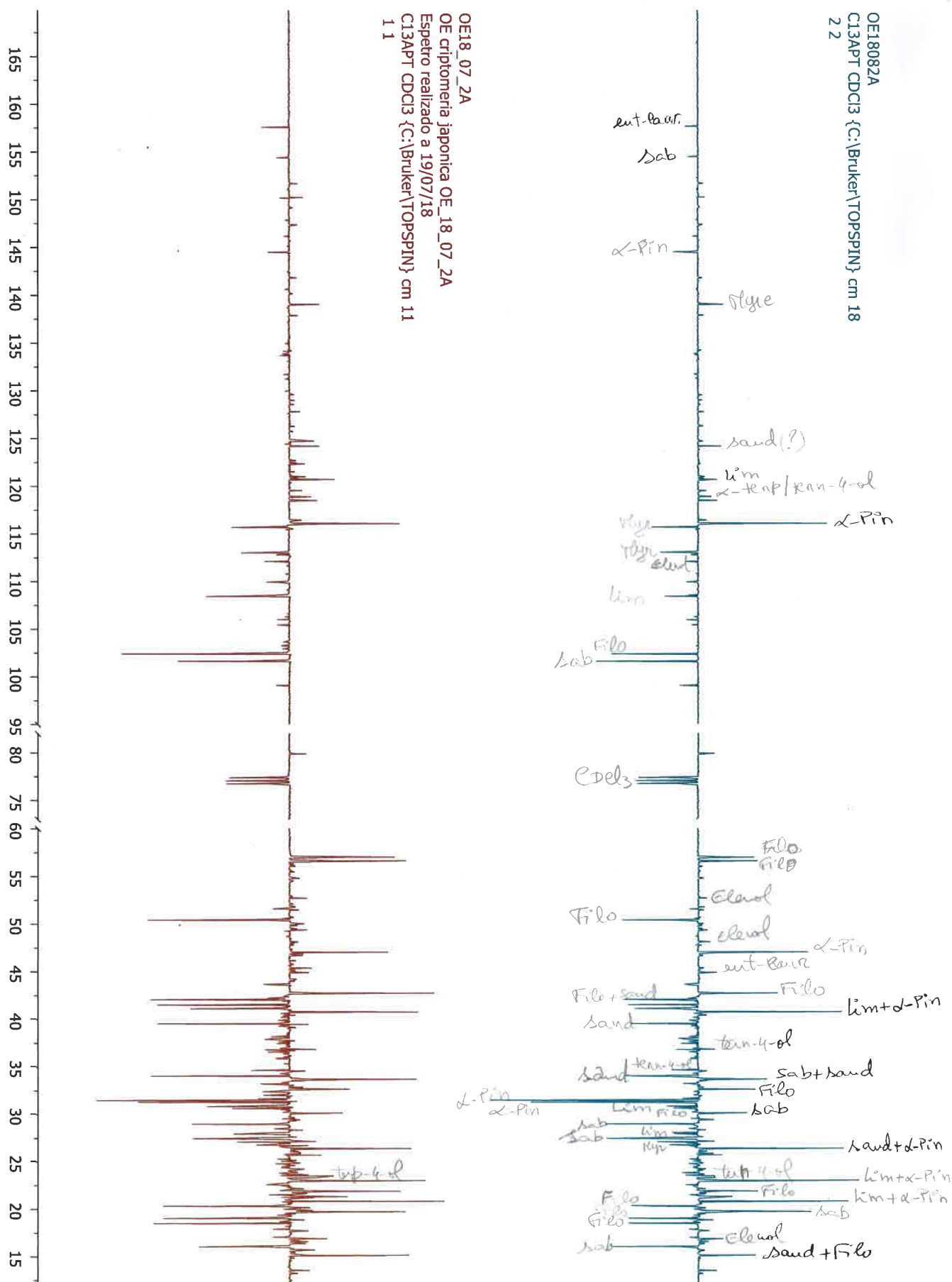


Figura 4- Comparação dos espectros de ^{13}C RMN (APT) do OE de 18082A (verde) e 18072A (castanho) em CDCl_3 (δ 10 – 170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: **α-Pin**- α-Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno; **γ-Ter** – γ-Terpineno; **Tern-4-ol**- Terpinen-4-ol; **Emol**- Elemol; **Filo**- Filocladeno; **ent-Caur**- ent-Caureno; **Sand**- Sandaracopamaradieno.

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

Analysis by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹³C 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 ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹³C 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) and Cora da Mata, Ribeirinha Grande, São Miguel, Azores, Portugal (Woods ca. 40 years).

Type of forest: Cultivar

Production Year / production month: 2018 / 08

Quota: 6 (+500m) and 2

Types of soils: Andosols

Part of plant: Aerial parts – tree branches

Extraction procedure: Steam-distillation

Sample: 3 Essential Oils (EOs); **A1**; **A2** and **2A**

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

Code (Year; month; quota; soil type; sample number)	Plant processing	Distillation time (h:min)	Yield (%, v/w)
18076A1	Uncut branches	2:00	0.28
18076A2	Cut branches	2:00	0.33
18072A	Uncut branches	2:00	0.17

The three samples of *C. japonica* EOs, representative of August 2018 provided by Azorina S.A., were analyzed by the ¹³C NMR technique simultaneously with the GC and GC-MS analyzes. Thus, following the same procedure used for samples from other moths, a comparative analysis of the chemical constituents of three EOs (**A1**; **A2** and **2A**) was proceeded.

The ¹³C RMN chemical profiles from August OEs 18086**A1** and 18086**A2**, (same quote and region) is similar. An increase of monoterpene contents, α -pinene, sabinene and limonene, was detected in the EO 18076A2 (cut branches) when compared with the EO 18066A1 (uncut branches), which corresponding to 50% of the total oil percentage. Moreover, a decrease of diterpenes, phyllocladene and *ent*-kaurene was also detected (Annex, Figure 1).

The EO 18086**A1** obtained from August uncut branches, 18076**A1**, is less rich in α -pinene, limonene, elemol, phyllocladene and *ent*-kaurene and richer in terpinen-4-ol, than July EO 18076A1 (Annex, Figure 2).

The EO 18086**A2** from August uncut branches have the same chemical composition than July EO (18076**A2**), despite an increase slightly in percentages of α -pinene, sabinene and γ -terpinen-4-ol was observed (Annex,

Figure 3).

A variation in percentages of the constituents of the EO 18082A from August uncut branches of Cora da Mata, Ribeirinha Grande, São Miguel (Woods ca. 40 years and quota 2) was identified in comparison to the July OE 18072A. In the EO18082A, an increase of α -pinene and a decrease of sabinene, limonene and phyllocladene was detected (Annex, Figure 4).

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



GOVERNO
DOS AÇORES



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu de
Desenvolvimento Regional