

Relatório no âmbito do projeto

Report on project

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

Janeiro, 2019

January, 2019



CESAM Lisboa



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	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)	13

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	<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 Dezembro de 2018.

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

<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 masculinos	Lote não estilhado	Branches from landscaping with strobili	Non-woodchips	Espigão, Água de Pau, Lagoa, São Miguel, Açores	Dec-18	SD	2:02	0.20	18124A	
Ramadas e bicadas com estróbilos masculinos	Lote não estilhado	Branches from landscaping with strobili	Non-woodchips	Achada, Nordeste, São Miguel, Açores	Dec-18	SD	2:00	0.23	18126A1	
Ramadas e bicadas com estróbilos masculinos	Lote não estilhado	Branches from landscaping with strobili	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	Dec-18	SD	2:04	0.23	18126A2	

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. H: Hydrodistillation. SD: Steam distillation.

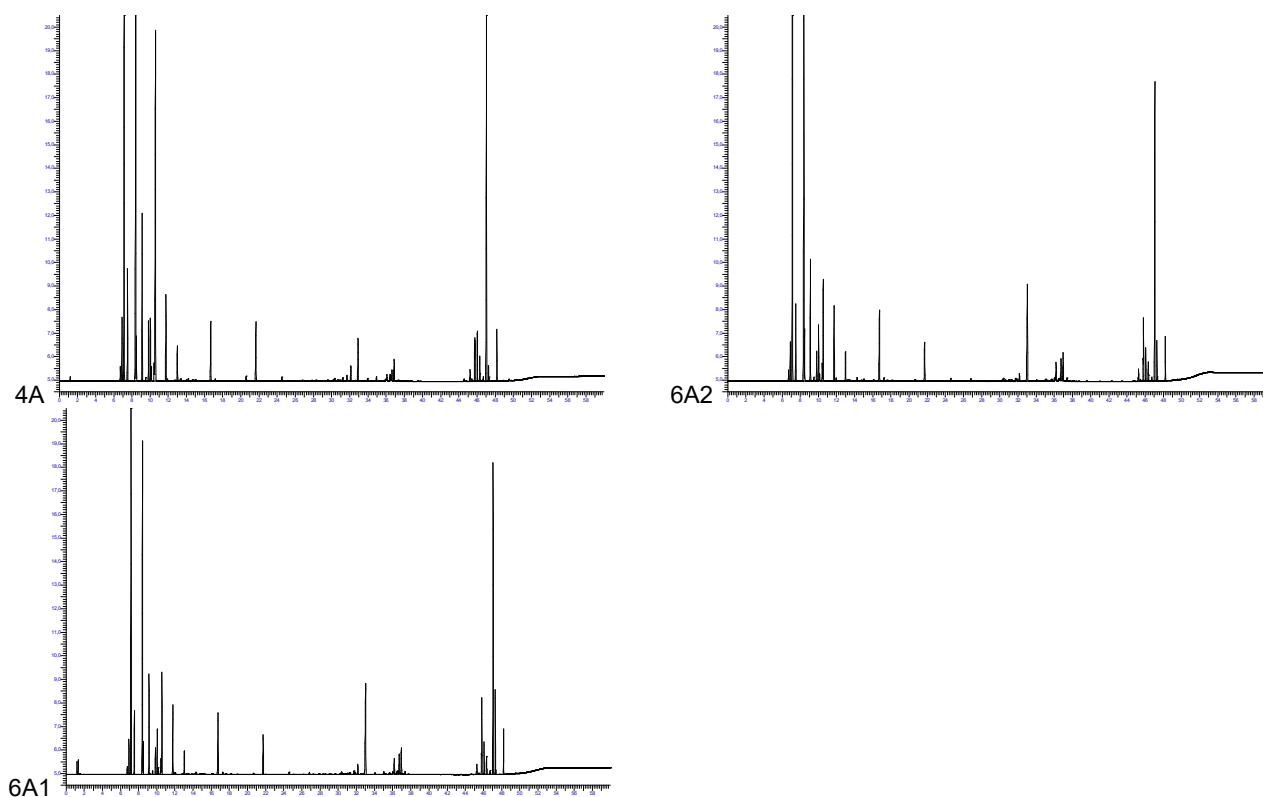


Fig. 1. Perfis cromatográficos das amostras analisadas. / **Fig. 1.** Gas chromatography profiles, taken on the DB-1 column, of the essential oils isolated from *Cryptomeria japonica* samples (for sample codes, see Table 1).

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

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

Componentes	Components	IR / RI	18124A	18126A1	18126A2
Triciclono	Tricyclene	921	0.3	0.3	0.3
α -Tujeno	α -Thujene	924	1.6	1.3	1.1
α -Pineno	α -Pinene	930	17.7	21.9	23.4
Canfeno	Camphene	938	2.8	2.4	2.3
Sabineno	Sabinene	958	14.3	16.6	15.1
β -Pineno	β -Pinene	963	0.9	1.2	1.0
β -Mirceno	β -Myrcene	975	4.6	3.9	3.8
α -Felandreno	α -Phellandrene	995	0.1	0.2	0.1
δ -3-Careno	δ -3-Carene	1000	1.7	1.1	1.0
α -Terpineno	α -Terpinene	1002	1.7	1.9	1.8
<i>p</i> -Cimeno	<i>p</i> -Cymene	1003	0.4	0.3	0.2
β -Felandreno	β -Phellandrene	1005	0.6	0.7	0.6
Limoneno	Limonene	1009	13.9	4.5	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	2.6	3.0	2.9
Hidrato de <i>trans</i> -sabineno	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1037	0.1	0.1	0.1
2,5-Dimetil estireno	2,5-Dimethyl styrene	1059	t	t	t
Terpinoleno	Terpinolene	1064	1.0	1.1	1.1
Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1066	t	t	t
Linalol	Linalool	1074	0.1	t	0.1
<i>trans</i> -Tujona	<i>trans</i> -Thujone	1081	t	t	t
Acetato de 1-octen-3-ilo	1-Octen-3-yl acetate	1086	t	t	t
α -Canfolenal	α -Campholenal	1092	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	0.2
Cânfora	Camphor	1102	t	t	t
<i>cis</i> - <i>p</i> -2-Menten-1-ol	<i>cis</i> - <i>p</i> -2-Menthen-1-ol	1114	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	0.1
Borneol	Borneol	1134	t	t	t
<i>cis</i> -Pinocanfona	<i>cis</i> -Pinocamphone	1134	t	t	t
Terpinen-4-ol	Terpinen-4-ol	1148	2.3	3.4	3.5
Salicilato de metilo	Methyl salicylate	1159	t	t	t
α -Terpineol	α -Terpineol	1159	0.1	0.1	0.2
<i>cis</i> -Piperitol	<i>cis</i> -Piperitol	1182	t	t	t
<i>trans</i> -Piperitol	<i>trans</i> -Piperitol	1189	t	t	t
Acetato de α -fenchilo	α -Fenchyl acetate	1200	t	t	t
Piperitona	Piperitone	1211	t	t	t
Geraniol	Geraniol	1236	t	t	t
Acetato de linalilo	Linalyl acetate	1245	0.2	t	0.1
<i>trans</i> -Anetole	<i>trans</i> -Anethole	1254	t	t	t
Acetato de bornilo	Bornyl acetate	1265	2.2	2.1	1.8
Acetato de <i>cis</i> -verbenilo	<i>cis</i> -Verbenyl acetate	1266	t	t	t
Acetato de α -terpenilo	α -Terpenyl acetate	1334	0.2	0.1	0.2
α -Cubebeno	α -Cubebene	1345	t	t	t
Acetato de geraniol	Geranyl acetate	1370	t	t	t
α -Copaeno	α -Copaene	1375	t	t	t
β -Bourboneno	β -Bourbonene	1379	t	t	t
β -Elemeno	β -Elemene	1388	t	0.1	0.1
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 -Muroleno	γ -Murolene	1469	t	t	t
Germacreno D	Germacrene D	1474	0.1	0.1	0.2
Biclogermacreno	Bicyclogermacrene	1487	t	t	t
α -Muroleno	α -Murolene	1494	0.2	0.1	0.1
β -Bisaboleno	β -Bisabolene	1500	0.2	0.2	0.1
γ -Cadineno	γ -Cadinene	1500	0.2	0.1	0.1
<i>trans</i> -Calameneno	<i>trans</i> -Calamenene	1505	t	t	t
δ -Cadineno	δ -Cadinene	1505	0.7	0.5	0.4
Elemol	Elemol	1530	1.9	6.1	7.0
<i>trans</i> -Nerolidol	<i>trans</i> -Nerolidol	1549	t	t	t
Germacreno D-4-ol *	Germacrene D-4-ol *	1557	0.2	0.1	t
Óxido de β -cariofileno	β -Caryophyllene oxide	1561	t	t	t
Cedrol	Cedrol	1574	t	t	t
Anidrooplopanona	Anhydrooplopanone (= β -Oplopanone)	1576	0.2	0.1	0.1
10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	1593	t	0.1	0.2
γ -Eudesmol	γ -Eudesmol	1609	0.4	0.6	1.2
T-Cadinol	T-Cadinol	1616	t	t	t
T-Murolol	T-Murolol	1616	0.2	0.3	0.4

Componentes	Components	IR / RI	18124A	18126A1	18126A2
α -Muurolol (= δ -Cadinol)	α -Muurolol (= δ -Cadinol)	1618	0.2	0.2	t
β -Eudesmol	β -Eudesmol	1620	0.6	1.2	1.5
α -Cadinol	α -Cadinol	1626	t	t	0.3
α -Eudesmol	α -Eudesmol	1634	1.1	1.6	1.5
Criptomeriona *	Cryptomerione *	1686	t	t	t
Acetato de oplopanoilo *	Oplopanoyl acetate *	1808	0.1	t	t
Rimueno	Rimueno	1814	t	t	t
Isopimara-9(11),15-dieno	Isopimara-9(11),15-diene	1821	0.4	0.5	0.6
NI 1	UI 1	1915	0.8	1.1	1.2
NI A'	UI A'	1915	0.8	1.1	1.0
NI 2 (Isokaurene *)	UI 2 (Isokaurene *)	1915	0.6	0.8	0.7
NI 3	UI 3	1924	1.3	1.0	1.1
Sandaracopimara-8(14),15-dieno	Sandaracopimara-8(14),15-diene	1956	0.7	0.5	0.9
Isofilocladeno *	Isophyllocladene *	1956	0.2	0.6	0.1
Filocladeno*	Phyllocladene	2006	17.0	11.8	12.8
Caureno	Kaurene	2044	0.7	2.6	1.3
Abietadieno	Abietadiene	2060	t	t	t
NI 4 (Nezucol *)	UI 4 (Nezucol *)	2176	1.3	1.2	1.4
Phyllocladanol *	Phyllocladanol *	2200	t	t	t
% Identificação	% identification		95.3	93.9	94.0
Componentes agrupados	Grouped components				
Hidrocarbonetos monoterpénicos	Monoterpene hydrocarbons		64.2	60.4	58.2
Monoterpenos oxigenados	Oxygen-containing monoterpenes		5.4	5.9	6.2
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	Sesquiterpene hydrocarbons		1.4	1.1	1.0
Sesquiterpenos oxigenados	Oxygen-containing sesquiterpenes		4.9	10.3	12.2
Hidrocarbonetos diterpénicos	Diterpene hydrocarbons		19.4	16.2	16.3
Diterpenos oxigenados	Oxygen-containing diterpenes		t	t	t
Fenilpropanóides	Phenylpropanoids		t	t	t
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 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: Espigão, Água de pau, Lagoa, São Miguel, Açores (**4A**); Achada, Nordeste, São Miguel, Açores (Mata ca. 50 anos) (**6A1**); Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores (Mata ca. 50 anos) (**6A2**); Portugal.

Tipo de mata: Cultivo

Ano / mês de recolha: 2018 / 12

Cota: 4 e 6

Tipo de solo: Andossolo (A)

Parte da planta: parte aérea – ramadas, bicadas e estróbilos masculinos (RB+E)

Método de extração: Destilação por arrastamento de vapor

Amostra: 3 Óleos essenciais (OE); **4A**, **6A1** e **6A2**

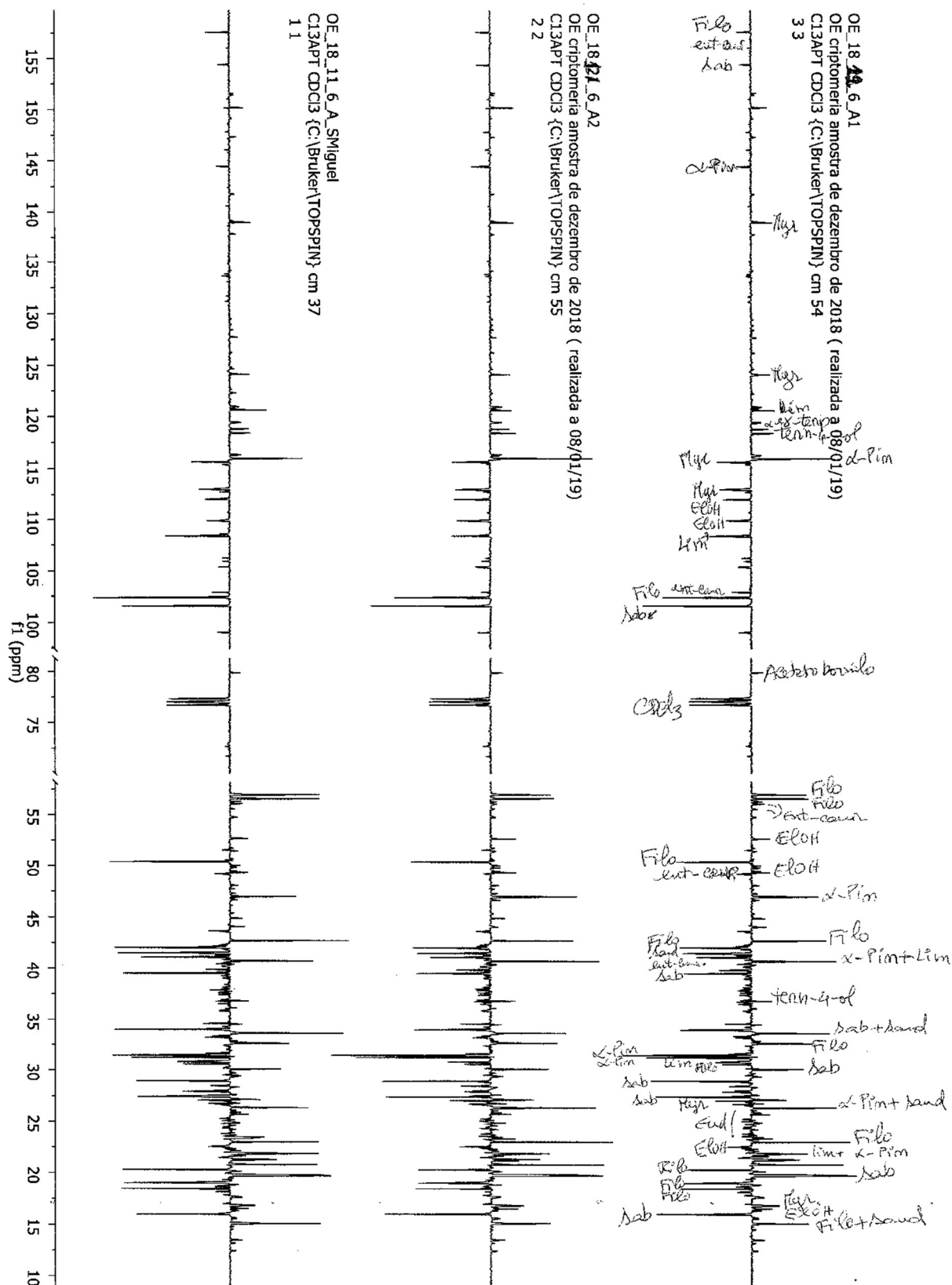
Tabela 1. Código das amostras referentes a dezembro de 2018 e condições de extração dos OEs de *C. japonica*.

Código (ano; mês; cota; tipo de solo; nº da amostra)	Processamento da planta (Estado da planta)	Tipo de Mata	Método de Extração	Tempo de destilação (h:min)	Rendimento (%, v/p)
18124A	Amostra não estilhada; RB+E (Floral)	Cultivo	Arraste de vapor	2:02	0,20
18126A1	Amostra não estilhada; RB+E (Floral)	Cultivo	Arraste de vapor	2:00	0,23
18126A2	Amostra não estilhada; RB+E (Floral)	Cultivo	Arraste de vapor	2:04	0,23

Em simultâneo com as análises de GC e GC-MS dos OEs procedeu-se à análise por ^{13}C RMN das 3 amostras de OEs de *C. japonica*, representativas do mês de dezembro 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 da Ilha de São Miguel, **4A** e **6A1** e **6A2**.

O perfil químico de ^{13}C RMN do OE **18124A** resultante de amostras de ramadas e bicadas não estilhadas misturadas **com estróbilos masculinos**, da mesma cota e do mesmo local da ilha de **São Miguel**, comparativamente ao OE 18114A é semelhante. Deteta-se que, no OE do mês de dezembro, 18124A, aumentou ligeiramente a quantidade de filocladeno e limoneno e diminuiu também ligeiramente o α -pineno e sabineno, com desaparecimento de *ent*-caureno. À semelhança do mês anterior, identificaram-se todos os outros compostos já existentes nos OE nas amostras 4A, elemol, mirceno, eudesmóis, terpinen-4-ol e acetato de bornilo, mas em percentagens reduzidas (Anexo, Figura 1).

O perfil químico de ^{13}C RMN do OE **18126A1** das ramas e bicadas não estilhadas misturadas com estróbilos masculinos, de cota e do mesmo local da Ilha de São Miguel, referente ao mês de dezembro é semelhante ao OE do mês anterior (18116A), não se observando variação significativa na percentagem dos constituintes do OE (Anexo, Figura 2). O conteúdo de filocladeno, *ent*-caureno e limoneno deste OE é ligeiramente menor que o do mês anterior. Estes OEs, 18126A1 e 18116A, têm um perfil químico muito semelhante com o OE **18126A2** (Achada) oriundo de amostras de ramas e bicadas não estilhadas misturadas com estróbilos masculinos de cota e local próximos de 6A1 (Achadinha).



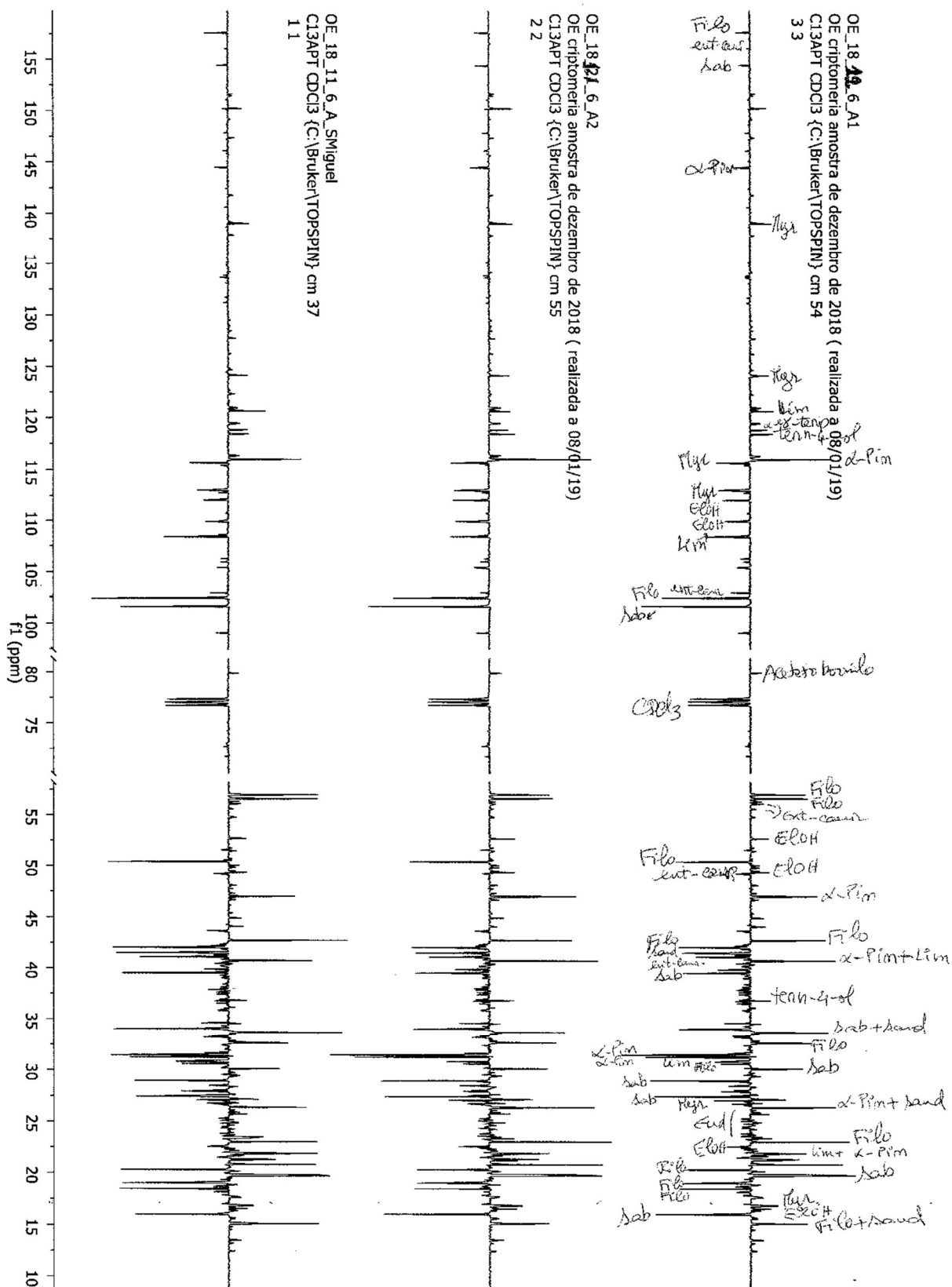


Figura 2- Comparação dos espectros de ^{13}C RMN (APT) do OE de **18126A1**, **18126A2** e **18116A** em CDCl_3 (δ 10 –170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: **α -Pin**- α -Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno; **α -** e **γ -Terp**– Terpineno; **Tern-4-ol**- Terpinen-4-ol; **Cad**- Cadinol; **EIOH**- Elemol; **Filo**- Filocladeno; **ent-Caur**- ent-Caureno; **Sand**- Sandaracopamaradieno; Acetato de bornilo; **Eud**- Eudesmol.

Agradecimentos: ao CQB no âmbito do projeto UID/MULTI/0062/2013 financiado pela FCT/MCTES 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: Espigão, Água de pau, Lagoa, São Miguel, Azores (**4A**); Achada, Northeast, São Miguel, Azores, (**6A1**) (Woods ca. 50 years); Achadinha, Northeast, São Miguel, Azores, (**6A2**); Portugal.

Type of forest: Cultivar

Production Year / production month: 2018 / 12

Quota: 4 and 6

Type of soils: Andosols (A)

Part of plant: Aerial parts – Strobiles and branches from landscaping (RB+E)

Extraction procedure: Steam-distillation

Sample: 3 Essential Oils (EOs); **4A**, **6A1** and **6A2**

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

Code (Year; month; quota; soil type; sample number)	Plant processing (Plant state)	Type of forest	Extraction Method	Distillation time (h:min)	Yield (%, v/w)
18124A	Uncut RB+E (Floral)	Cultivar	Steam-distillation	2:02	0.20
18126A1	Uncut RB+E (Floral)	Cultivar	Steam-distillation	2:00	0.23
18126A2	Uncut RB+E (Floral)	Cultivar	Steam-distillation	2:04	0.23

Three samples of *C. japonica* EOs, representative of November 2018 provided by Azorina S.A., were analyzed by the ^{13}C NMR technique concurrently with the GC and GC-MS analyzes. Thus, following the same procedure used for the other samples from previous months, a comparative analysis of the chemical constituents of the three EOs from São Miguel was progressed.

The ^{13}C RMN chemical profiles from November EOs **18124A**, from uncut strobiles and branches from landscaping of the same quote and region of the São Miguel island in comparison with November EO **18114A** are similar. However, the EO **18124A** contains a slightly increase of phyllocladene and limonene with a slightly decrease of α -pinene and sabinene, no *ent*-kaurene was detected. Similar to the previous month in this EO are also detected with diminish percentages, elemol, myrcene, eudesmol, terpinen-4-ol and bornyl acetate (Annex, Figure 1).

The ^{13}C RMN chemical profiles of December EO **18126A1** and **18126A2** from uncut strobiles and branches from landscaping of the same quote and region of the São Miguel island are similar with EO of the previous month (**18116A**); no variation in the percentage of oil constituents was detected (Annex, Figure 2). The phyllocladene, *ent*-kaurene and limonene content were marginally reduced.

Figures 1 and 2 were illustrated in pages 11 and 12.

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



GOVERNO
DOS AÇORES



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu de
Desenvolvimento Regional