

Relatório no âmbito do projeto

Report on project

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

Maio, 2019 e 1º Relatório Anual

May, 2019 and 1st Annual Report



Centro de
Biotecnologia
Vegetal

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.....	1
Análise de óleo essencial - <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
Resumo	1
1.1. Amostras analisadas de <i>Cryptomeria japonica</i>	1
1.2. Condições de análise	5
1.2.1. Óleos essenciais	5
1.2.1.1. Cromatografia Gasosa	5
1.2.1.2. Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa	5
1.2.1.3. Análise estatística.....	5
2. Resultados e Discussão	6
2.1. Composição química dos óleos essenciais das amostras colhidas em maio 2019	6
2.2. Comparação da composição química dos óleos essenciais das amostras colhidas entre maio 2018 e maio 2019	8
3. Referências	10
Essential oil analysis - <i>Cryptomeria japonica</i> (Thunb. ex L.f.) D.Don	11
Analysis by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS).....	11
Abstract	11
1.1. <i>Cryptomeria japonica</i> analyzed samples.....	11
1.2. Analytical conditions	11
1.2.1. Essential oils.....	11
1.2.1.1. Gas Chromatography (GC)	11
1.2.1.2. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).....	12
1.2.1.3. Statistical analysis	12
2. Results and Discussion	12
2.1. Composition of the essential oils from samples collected in May 2019.....	12
2.2. Comparison of the chemical composition from the samples collected between May 2018 and May 2019.....	12
3. References	13
 CQB	 14
Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C (¹³ C RMN).....	14
1. Procedimentos e condições de análise por ¹³ C RMN.....	14
2. Análise comparativa dos perfis químicos das amostras das Ilhas dos Açores.....	15
3. Conclusões.....	18
Analysis by ¹³ C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹³ C NMR)	20
1. ¹³ C NMR procedures and analysis conditions.....	20
2. Comparative analysis of chemical profiles of samples from Azores Islands.....	21
3. Conclusions.....	23

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

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

Resumo

Este relatório inclui a avaliação da composição química de óleos essenciais isolados de amostras de *Cryptomeria japonica* colhidas no mês de maio de 2019, e a comparação da composição química das sessenta amostras de óleos essenciais analisadas de maio de 2018 a maio de 2019. O relatório está organizado em duas secções separadas, em Português e em Inglês, ainda que as Tabelas e Figuras tenham uma estrutura bilingue, em simultâneo.

A composição química das amostras foi analisada por Cromatografia Gasosa (GC) e por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS), e utilizada na determinação da relação entre as diferentes amostras por análise aglomerativa em grupos.

1.1. Amostras analisadas de *Cryptomeria japonica*

Entre maio de 2018 e maio de 2019, foram recebidas, e analisadas, sessenta amostras de óleos essenciais isolados de amostras de criptoméria [*Cryptomeria japonica* (Thunb. ex L.f.) D.Don, Cupressaceae]. Duas amostras de Setembro não foram analisadas, por volume insuficiente de óleo essencial. A relação das, e tipo de amostras analisadas, a que reporta o presente relatório está detalha na Tabela 1.

Tabela 1. Relação, e tipo de amostras analisadas, de óleos essenciais (OE) de *Cryptomeria japonica*, recebidas entre maio de 2018 e maio de 2019. /

Table 1. Relation of analyzed samples, and sample types, from *Cryptomeria japonica* essential oils (OEs), received between May 2018 and May 2019.

Tipo de material		Sample type		Origem Provenance	IM WA (A/Y)	Cota Alt (m)	TS ST	MAC MYC	ME EP	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	± 50	<200	A	May-18	SD	1:00	0.22	18056A1
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	200	A	May-18	SD	1:30	0.22	18056A2
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	300	A	May-18	SD	2:00	0.22	18056A3
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	400	A	May-18	SD	2:30	0.22	18056A4
Ramadas e bicadas	Lote estilhado (2h)	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	500	A	May-18	SD	0:25	0.31	18056A5
Ramadas e bicadas	Lote estilhado (2h)	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	>500	A	May-18	SD	0:55	0.31	18056A6
Ramadas e bicadas	Lote estilhado (2h)	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	>500	A	May-18	SD	1:25	0.31	18056A7

Tipo de material		Sample type		Origem Provenance	IM WA (A/Y)	Cota Alt (m)	TS ST	MAC MYC	ME EP	TD DT (h:min)	R Yield (% v/p)	Código Code
Ramadas e bicadas	Lote estilhado (2h)	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	>500	A	May-18	SD	1:55	0.31	18056A8
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	<200	A	Jun-18	SD	2:00	0.19	18066A1
Ramadas e bicadas	Lote estilhado (2h)	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	200	A	Jun-18	SD	2:00	0.25	18066A2
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Lomba de São Pedro, Ribeira Grande, São Miguel, Açores	± 50	400	A	Jun-18	SD	2:00	0.21	18064A
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Coroa da Mata, Ribeirinha, Ribera Grande, São Miguel, Açores	± 40	200	A	Jun-18	SD	2:05	0.18	18062A
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	>500	A	Jul-18	SD	2:05	0.16	18076A1
Ramadas e bicadas	Lote estilhado (2h)	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	>500	A	Jul-18	SD	2:05	0.28	18076A2
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Coroa da Mata, Ribeirinha, Ribera Grande, São Miguel, Açores	± 40	200	A	Jul-18	SD	2:05	0.23	18072A
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	>500	A	Aug-18	SD	2:00	0.28	18086A1
Ramadas e bicadas	Lote estilhado (2h:37min)	Branches from landscaping	Woodchips (2h:37min)	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	>500	A	Aug-18	SD	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	± 40	200	A	Aug-18	SD	2:00	0.17	18082A
Ramas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	Veredas, terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores	± 40	400		Sep-18	HD	1:30	na	18094L1
Ramas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	Veredas, terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores	± 40	400		Sep-18	HD	1:30	na	18094L2
Ramas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	Veredas, terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores	± 40	400		Sep-18	HD	1:30	np	18094L3
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Espigão, Água de Pau, Lagoa, São Miguel, Açores	± 50	>500	A	Sep-18	SD	2:00	0.08	18094A
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 40	400	A	Sep-18	SD	2:00	0.22	18096A
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Pasto comprido da Pacheca, Lomba da Maia, Ribeira Grande, São Miguel, Açores	± 40	500	A	Sep-18	SD	2:00	np	18095A
Estróbilos verdes	Lote não estilhado	Green strobili from	Non-woodchips	Espigão, Água de Pau, Lagoa, São	± 50	>500	A	Sep-18	HD	1:31	np	18094A1

Tipo de material		Sample type		Origem Provenance	IM WA (A/Y)	Cota Alt (m)	TS ST	MAC MYC	ME EP	TD DT (h:min)	R Yield (% , v/p)	Código Code
Estróbilos castanhos	Lote não estilhado	landscaping Brown strobili from	Non-woodchips	Miguel, Açores Espigão, Água de Pau, Lagoa, São Miguel, Açores	± 50	>500	A	Sep-18	HD	1:35	np	18094A2
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	landscaping Branches from	Non-woodchips	Miguel, Açores Espigão, Água de Pau, Lagoa, São Miguel, Açores	± 50	>500	A	Oct-18	SD	2:10	0.29	18104A
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	landscaping Branches from	Non-woodchips	Miguel, Açores Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 40	400	A	Oct-18	SD	2:06	0.24	18106A
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	landscaping Branches from	Non-woodchips	Miguel, Açores Pasto comprido da Pacheca, Lomba da Maia, Ribeira Grande, São Miguel, Açores	± 40	500	A	Oct-18	SD	2:08	0.30	18105A
Ramadas e bicadas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Hand woodchips	Três Cantos, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores	> 40	400	L	Nov-18	HD	1:33	0.17	1_18114 L1
Ramadas e bicadas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Hand woodchips	Viveiro Florestal da Falca, S. Bartolomeu, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores	2	400	A	Nov-18	HD	2:00	0.09	2_18114 A2
Ramadas e bicadas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Hand woodchips	Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores	2 - 3	400	L	Nov-18	HD	1:40	0.39	3_18114 L3
Ramadas e bicadas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Hand woodchips	Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores	2 - 3	400	L	Nov-18	HD	1:43	0.40	4_18114 L4
Ramas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Hand woodchips	Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores	40	400	L	Nov-18	HD	1:43	0.29	5_18114 L5
Ramas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Hand woodchips	Encosta do Pico, Aqualva, Praia da Vitória, Terceira, Açores	30	500	A	Nov-18	HD	1:43	0.40	6_18115 A6
Ramadas e bicadas com estróbilos	Lote não estilhado	Branches from landscaping with strobili	Non-woodchips	Espigão, Água de Pau, Lagoa, São Miguel, Açores	± 50	>500	L	Nov-18	SD	2:05	0.32	18114A
Ramadas e bicadas com estróbilos	Lote não estilhado	Branches from landscaping with strobili	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	>500	A	Nov-18	SD	2:05	0.22	18116A
Ramadas e bicadas com estróbilos ♂	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♂ strobili	Non-woodchips	Espigão, Água de Pau, Lagoa, São Miguel, Açores	± 50	400	A	Dec-18	SD	2:02	0.20	18124A
Ramadas e bicadas com estróbilos ♂	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♂ strobili	Non-woodchips	Achada, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	>600	A	Dec-18	SD	2:00	0.23	18126A1
Ramadas e bicadas com estróbilos ♂	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♂ strobili	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	>600	A	Dec-18	SD	2:04	0.23	18126A2
Ramadas e bicadas com estróbilos ♂	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♂ strobili	Non-woodchips	Lomba de São Pedro, Ribeira Grande, São Miguel, Açores	± 50	400	A	Jan-19	SD	2:00	0.17	19014A
Ramadas e bicadas com estróbilos ♂	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♂ strobili	Non-woodchips	Achada, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	>600	A	Jan-19	SD	2:00	0.21	19016A1
Ramadas e bicadas com estróbilos ♂	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♂ strobili	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	>600	A	Jan-19	SD	2:00	0.18	19016A2

Tipo de material		Sample type		Origem Provenance	IM WA (A/Y)	Cota Alt (m)	TS ST	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	Santo António, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	500	A	Feb-19	SD	1:10	0.08	19025A
Ramadas e bicadas com estróbilos ♂	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♂ strobili	Non-woodchips	Cumeeiras, Sete Cidades, São Miguel, Açores	± 40	400	A	Feb-19	SD	2:00	0.19	19024A
Ramadas e bicadas com estróbilos ♂	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♂ strobili	Non-woodchips	Achada, Nordeste, São Miguel, Açores	± 50	>600	A	Feb-19	SD	2:00	0.24	19026A
Ramadas e bicadas com estróbilos ♀	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♀ strobili	Non-woodchips	Praia, Cais do Pico, Pico, Açores	± 30	>600	A	Mar-19	SD*	2:10	np	19036A P
Ramadas e bicadas com estróbilos ♀	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♀ strobili	Non-woodchips	Praia, Cais do Pico, Pico, Açores	± 30	>600	L	Mar-19	SD*	2:08	np	19036L P
Ramadas e bicadas com estróbilos ♂	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♂ strobili	Non-woodchips	Encosta dos Altares, Praia da Vitória, Terceira, Açores	± 40	500	A	Mar-19	HD	2:00	np	19035A T1
Ramadas e bicadas com estróbilos ♂	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♂ strobili	Non-woodchips	Encosta dos Altares, Praia da Vitória, Terceira, Açores	± 40	500	A	Mar-19	SD*	2:00	np	19035A T2
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, S. Miguel, Açores	± 50	500	A	Mar-19	SD	2:02	0.26	19036A
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Achada, Nordeste, S. Miguel, Açores	± 40	400	A	Mar-19	SD	2:03	0.29	19036A2
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Cumeeiras, Sete Cidades, S. Miguel, Açores	± 50	>600	A	Mar-19	SD	2:08	0.28	19034A
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, S. Miguel, Açores	± 50	>600	A	Apr-19	SD	2:00	0.24	19046A
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Achada, Nordeste, S. Miguel, Açores	± 50	>600	A	Apr-19	SD	2:02	0.21	19046A2
Ramadas e bicadas com estróbilos ♀	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♀ strobili	Non-woodchips	Prainha, São Roque do Pico, Pico, Açores	± 30	400	A	Apr-19	SD	2:00	0.11	19044A P
Ramadas e bicadas com estróbilos ♀	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♀ strobili	Non-woodchips	Prainha, São Roque do Pico, Pico, Açores	± 30	400	L	Apr-19	SD	2:05	0.13	19044L P
Ramadas e bicadas com estróbilos ♀	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♀ strobili	Non-woodchips	Achadinha, Nordeste, S. Miguel, Açores	± 50	>600	A	May-19	SD	2:00	0.19	19056A
Ramadas e bicadas com estróbilos ♀	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♀ strobili	Non-woodchips	Achada, Nordeste, S. Miguel, Açores	± 50	>600	A	May-19	SD	2:00	0.24	19056A2
Ramadas e bicadas com estróbilos ♀	Lote não estilhado	Branches from landscaping with ♀ strobili	Non-woodchips	Cumeeiras, Sete Cidades, S. Miguel, Açores	± 50	400	A	May-19	SD	2:00	0.26	19054A
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Prainha, São Roque do Pico, Pico, Açores	± 30	400	L	May-19	SD	2:00	0.18	19054L P
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	Prainha, São Roque do Pico, Pico, Açores	± 30	400	A	May-19	SD	2:00	0.20	19054A P

A: Ano. Y: Year. M: Mês / Month. IM: Idade da mata. WA: Wood age. Alt: Altitude. TS: Tipo Solo. ST: Soil Type. A: Andossolo / Andosol. L: Litossolo / Lithosol. 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. * Óleo essencial obtido de material destilado no Pico, enquanto o restante material foi destilado em S. Miguel / Essential oil obtained from plant material steam-distilled in Pico, whereas the remaining material was distilled in S. Miguel. na: amostras não analisadas por falta de OE / Samples not analyzed due to EO lack. np: dados não providenciados / data not provided.

1.2. Condições de análise

1.2.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais fornecidos foram analisados por GC com Detetor de Ionização de Chama (GC-FID), para quantificação dos componentes, e por GC-MS, para identificação dos componentes voláteis, de acordo com metodologia utilizada no laboratório, como detalhado em Faria *et al.* (2016).

1.2.1.1. Cromatografia Gasosa

As análises de CG-FID foram efetuadas num cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 400 equipado com dois Detetores de Ionização de Chama (DIC), um sistema de tratamento de dados e um injetor, no qual foram instaladas duas colunas de polaridade diferente: DB-1 de sílica fundida (100% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.) e DB-17HT de sílica fundida [(50% fenil)-metilpolisiloxane, 30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,15 µm; J & W Scientific Inc.). A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida isotérmica durante 10 min, num total de 61,67 min de corrida. Temperatura do injetor e dos detetores, 280°C e 300°C, respetivamente. Gás de arrastamento, hidrogénio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s. A composição percentual dos óleos essenciais foi determinada pela integração das áreas dos picos sem utilização de fatores de correção. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de duas injeções por óleo essencial.

1.2.1.2. Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa

As análises de CG-MS foram efetuadas num cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 600 equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.) ligado a um espectrómetro de massa Perkin-Elmer Clarus 600T (versão de software 5.4.2.1617, Perkin Elmer, Shelton, CT, USA). As condições de operação do forno foram como detalhadas em 1.2.1.1. Temperatura da linha de transferência, 280°C temperatura da câmara de ionização, 220°C; gás de arrastamento, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s; relação de repartição de fluxo, 1:40; energia de ionização, 70 eV; corrente de ionização, 60 µA; gama de massas, 40-300 u; tempo de varrimento, 1 s.

A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção, em relação aos dos *n*-alcanos e espectros de massa, com os de padrões sintetizados no laboratório, padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos essenciais existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa também desenvolvida no laboratório.

1.2.1.3. Análise estatística

A composição percentual dos óleos essenciais foi utilizada na determinação da relação entre as diferentes amostras, pela análise de *cluster*, usando o programa NTSYS (Rohlf, 1992). A correlação foi selecionada como medida de semelhança e utilizou-se o agrupamento segundo a associação média (UPGMA) na definição dos *clusters*. O grau de correlação foi avaliado de acordo com Pestana e Gageiro (2000) em: muito elevado, com uma correlação entre 0,9 e 1, elevado, entre 0,7 e 0,89, moderado, entre 0,4 e 0,69, baixo, entre 0,2 e 0,39 e muito baixo se <0,2.

2. Resultados e Discussão

2.1. Composição química dos óleos essenciais das amostras colhidas em maio 2019

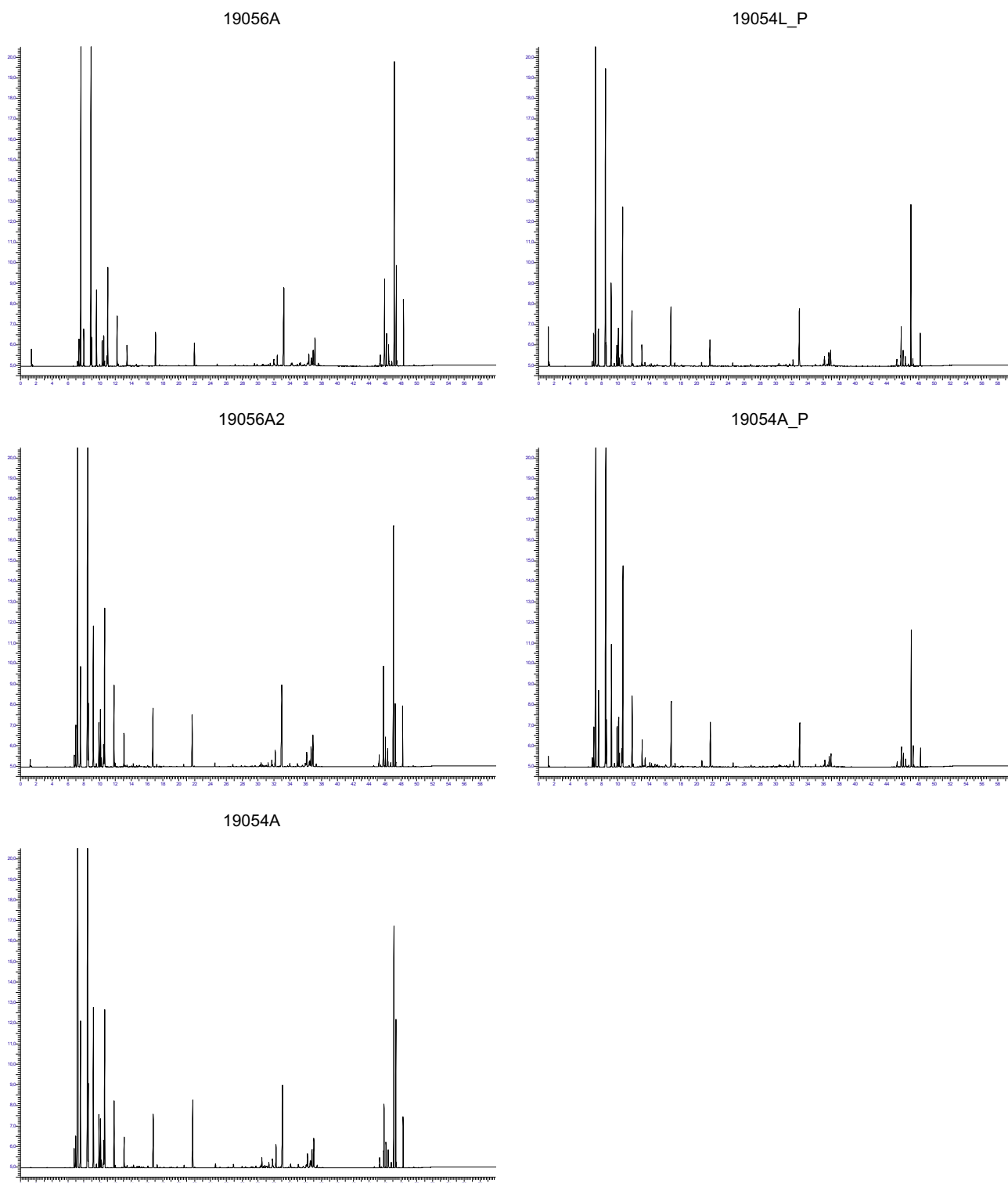


Figura 1. Perfis cromatográficos, obtidos numa coluna DB-1, das amostras analisadas de *C. japonica* (para os códigos das amostras, vide Tabela 1).

Figure 1. Gas chromatography profiles, taken on the DB-1 column, of the essential oils isolated from *C. japonica* samples (for sample codes, see Table 1).

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

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

Componentes	Components	IR / RI	19056A	19056A2	19054A	19054L_P	19054A_P
Triciclano	Tricyclene	921	0.2	0.3	0.4	0.2	0.3
α -Tujeno	α -Thujene	924	1.1	1.2	0.9	1.5	1.6
α -Pino	α -Pinene	930	15.1	22.2	29.8	17.9	24.9
Canfeno	Camphene	938	1.5	2.4	3.5	1.8	2.9
Sabineno	Sabinene	958	17.1	16.6	11.9	19.2	17.6
β -Pino	β -Pinene	963	1.7	1.4	1.5	1.4	1.6
β -Mirceno	β -Myrcene	975	3.2	4.0	4.1	4.2	4.9
α -Felandreno	α -Phellandrene	995	t	0.1	0.1	0.2	0.1
δ -3-Careno	δ -3-Carene	1000	1.2	1.2	1.3	1.1	1.7
α -Terpineno	α -Terpinene	1002	1.4	1.5	1.2	2.0	2.0
<i>p</i> -Cimeno	<i>p</i> -Cymene	1003	0.2	0.3	0.2	0.4	0.6
β -Felandreno	β -Phellandrene	1005	0.5	0.6	0.8	0.7	0.8
Limoneno	Limonene	1009	4.7	5.2	4.8	10.6	10.1
<i>cis</i> - β -Ocimeno	<i>cis</i> - β -Ocimene	1017	t	t	t	t	t
<i>trans</i> - β -Ocimeno	<i>trans</i> - β -Ocimene	1027	t	t	t	t	t
γ -Terpineno	γ -Terpinene	1035	2.3	2.5	1.9	3.2	3.1
Hidrato de <i>trans</i> -sabineno	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1037	0.1	0.1	t	0.1	0.1
2,5-Dimetil estireno	2,5-Dimethyl styrene	1059	t	t	t	t	t
Terpinoleno	Terpinolene	1064	1.0	1.1	0.9	1.2	1.2
Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1066	t	t	0.1	t	0.1
Linalol	Linalool	1074	t	t	t	0.1	0.5
<i>trans</i> -Tujona	<i>trans</i> -Thujone	1081	t	t	0.1	t	t
Acetato de 1-octen-3-ilo	1-Octen-3-yl acetate	1086	t	t	0.1	t	0.2
α -Canfolenal	α -Campholenal	1092	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	0.1	0.1	t	0.2	0.2
Cânfora	Camphor	1102	t	t	t	t	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	t	t	0.1
<i>trans</i> -Pinocanfona (= <i>trans</i> -3-Pinanona)	<i>trans</i> -Pinocamphone (= <i>trans</i> -3-Pinanone)	1121	t	t	t	t	t
Borneol	Borneol	1134	t	t	0.1	t	0.2
<i>cis</i> -Pinocanfona	<i>cis</i> -Pinocamphone	1134	t	t	t	t	t
Terpinen-4-ol	Terpinen-4-ol	1148	2.0	2.4	2.0	4.2	3.8
Salicilato de metilo	Methyl salicylate	1159	t	t	t	t	t
α -Terpineol	α -Terpineol	1159	t	0.1	0.1	0.2	0.2
<i>cis</i> -Piperitol	<i>cis</i> -Piperitol	1182	t	t	t	t	t
<i>trans</i> -Piperitol	<i>trans</i> -Piperitol	1189	t	t	t	t	t
Acetato de α -fenchilo	α -Fenchyl acetate	1200	t	t	t	t	t
Piperitona	Piperitone	1211	t	t	t	t	t
Geraniol	Geraniol	1236	t	t	t	t	t
Acetato de linalilo	Linalyl acetate	1245	t	0.1	0.1	0.3	0.4
<i>trans</i> -Anetole	<i>trans</i> -Anethole	1254	t	t	t	t	t
Acetato de bornilo	Bornyl acetate	1265	1.3	2.0	2.6	1.7	2.4
Acetato de <i>cis</i> -verbenilo	<i>cis</i> -Verbenyl acetate	1266	t	0.2	t	t	t
Acetato de α -terpenilo	α -Terpenyl acetate	1334	0.1	0.2	0.2	0.2	0.3
α -Cubebeno	α -Cubebene	1345	t	t	t	t	t
Acetato de geraniol	Geranyl acetate	1370	t	t	t	t	t
α -Copaeno	α -Copaene	1375	t	t	t	t	t
β -Bourboneno	β -Bourbonene	1379	t	t	t	t	t
β -Elemeno	β -Elemene	1388	0.1	0.1	t	0.1	t
β -Cariofileno	β -Caryophyllene	1414	0.2	0.1	t	t	t
β -Copaeno	β -Copaene	1426	0.2	t	0.2	t	t
α -Humuleno	α -Humulene	1447	t	t	t	t	t
γ -Muroleno	γ -Murolene	1469	0.1	t	0.1	t	0.1
Germacreno D	Germacrene D	1474	0.1	0.2	0.4	0.2	0.1
Biciclogermacreno	Bicyclogermacrene	1487	t	t	t	0.1	t
α -Muroleno	α -Murolene	1494	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
β -Bisaboleno	β -Bisabolene	1500	t	0.2	0.3	0.2	0.2
γ -Cadineno	γ -Cadinene	1500	0.7	0.4	0.5	t	0.1
<i>trans</i> -Calameneno	<i>trans</i> -Calamenene	1505	t	t	t	t	t
δ -Cadineno	δ -Cadinene	1505	0.7	0.3	1.0	0.5	0.4
Elemol	Elemol	1530	6.4	5.6	5.0	5.1	3.0
<i>trans</i> -Nerolidol	<i>trans</i> -Nerolidol	1549	t	0.2	0.2	t	t
Germacreno D-4-ol *	Germacrene D-4-ol *	1557	0.2	t	t	t	t
Óxido de β -cariofileno	β -Caryophyllene oxide	1561	t	t	t	t	t
Cedrol	Cedrol	1574	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

Componentes	Components	IR / RI	19056A	19056A2	19054A	19054L_P	19054A_P
Anidrooplopanona	Anhydrooplopanone (= β -Oplophenone)	1576	0.1	t	t	t	t
10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	1593	t	0.1	0.1	0.1	0.1
γ -Eudesmol	γ -Eudesmol	1609	0.3	0.6	0.7	0.9	0.5
T-Cadinol	T-Cadinol	1616	0.3	0.2	0.6	0.3	t
T-Murolol	T-Murolol	1616	0.2	0.4	0.4	0.3	0.1
α -Murolol (= δ -Cadinol)	α -Murolol (= δ -Cadinol)	1618	0.3	0.4	0.4	0.1	0.2
β -Eudesmol	β -Eudesmol	1620	1.3	1.5	0.1	1.3	0.8
α -Cadinol	α -Cadinol	1626	0.1	0.4	0.6	0.8	t
α -Eudesmol	α -Eudesmol	1634	2.0	1.3	1.0	0.5	0.9
Criptomeriona *	Cryptomerione *	1686	t	t	t	t	t
Acetato de oplopanoilo *	Oplopanoyl acetate *	1808	t	t	t	t	t
Rimueno	Rimueene	1814	t	t	t	t	t
Isopimara-9(11),15-dieno	Isopimara-9(11),15-diene	1821	0.6	0.5	0.4	0.5	0.3
NI 1	UI 1	1915	3.0	3.1	1.5	1.0	0.5
NI A'	UI A'	1915	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5
NI 2 (Isokaurene *)	UI 2 (Isokaurene *)	1915	0.2	0.1	0.5	0.6	0.3
NI 3	UI 3	1924	1.2	1.0	0.7	0.9	0.6
Sandaracopimara-8(14),15-dieno	Sandaracopimara-8(14),15-diene	1956	1.0	0.8	0.4	0.7	0.5
Isofilocladeno *	Isophyllocladene *	1956	0.1	t	t	t	t
3' Cryptomeria	3' Cryptomeria	1977	t	0.1	t	0.1	t
Filocladeno*	Phyllocladene	2006	16.0	11.0	8.2	9.4	6.4
Caureno	Kaurene	2044	3.8	2.2	4.6	0.3	0.9
Abietadieno	Abietadiene	2060	t	t	t	t	t
NI 4	UI 4 (Nezukol *)	2176	2.3	1.8	1.3	1.4	0.8
Phyllocladanol *	Phyllocladanol *	2200	t	t	t	t	t
% Identificação	% identification		90.1	92.7	94.7	94.9	97.2
Componentes agrupados	Grouped components						
Hidrocarbonetos monoterpênicos	Monoterpene hydrocarbons		51.2	60.6	63.3	65.6	73.4
Monoterpenos oxigenados	Oxygen-containing monoterpenes		3.6	5.2	5.3	7.0	8.4
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos	Sesquiterpene hydrocarbons		2.3	1.4	2.6	1.2	1.0
Sesquiterpenos oxigenados	Oxygen-containing sesquiterpenes		11.4	10.9	9.3	9.6	5.8
Hidrocarbonetos diterpênicos	Diterpene hydrocarbons		21.6	14.6	14.1	11.5	8.4
Diterpenos oxigenados	Oxygen-containing diterpenes		t	t	t	t	t
Fenilpropanóides	Phenylpropanoids		t	t	t	t	t
Outros	Others		t	t	0.1	t	0.2

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%).

2.2. Comparação da composição química dos óleos essenciais das amostras colhidas entre maio 2018 e maio 2019

A composição percentual dos óleos essenciais de *C. japonica* foi utilizada na determinação da relação entre as diferentes amostras por análise aglomerativa em grupos, evidenciando dois grupos (clusters), clusters I e II, quimicamente moderadamente correlacionadas ($S_{cor} > 0,5$), Figura 2.

O cluster I inclui 56 amostras, divididas em dois sub-clusters, Ia, com 50 amostras e Ib, com 6, evidenciados na Figura 2 com a bordadura azul e laranja, respetivamente. O cluster II, na Figura 2 com bordadura verde, inclui as 4 amostras remanescentes, que são caracterizadas por serem as amostras de maiores teores de caureno (13-31%), Tabela 3. O cluster I caracteriza-se por incluir as amostras com maiores teores de filocladeno (2-20%), mas separa-se em dois sub-clusters, essencialmente pela diferença nos teores de α -pineno (cluster Ia 15-49%, cluster Ib 6-16%), Tabela 3.

Não se evidencia na Figura 2 uma organização preferencial por cota. As amostras com estróbilos, femininos e masculinos, estão preferencialmente agrupadas num dos sub-clusters do sub-cluster Ia, como representado na Figura 2, mas todas essas amostras são quimicamente muito semelhantes às restantes agrupadas no mesmo sub-cluster ($S_{cor} > 0,9$).

O sub-cluster Ib, com exceção de uma amostra, agrupa óleos essenciais que foram obtidos por

Detailed description of the dendrogram: The dendrogram illustrates the hierarchical clustering of 40 samples. The x-axis, labeled 'Correlation Coefficient', ranges from 0.0 to 1.0. The y-axis lists the samples, which are grouped into three main clusters: Ia (blue box), Ib (orange box), and II (green box). Cluster Ia (blue box) contains 28 samples, including 19056A, 19014A, 19036A, 18106A, 18116A, 19054L_P, 19036L_P, 18124A, 19056A2, 18126A1, 18126A2, 19046A2, 19025A, 19044L_P, 19036A_P, 18114A, 19024A, 19016A1, 19016A2, 18105A, 18104A, 19054A, 18064A, 18082A, 19026A, 18096A, 18095A, 19054A_P, 19036A2, 18076A1, 18056A4, 18094A, 18072A, 18066A1, 19046A, 18086A2, 18076A2, 18056A1, 18056A3, 18056A2, 18086A1, 18066A2, 18056A5, 18056A6, 18056A7, 18056A8, 19044A_P, 18094A1, 18062A, and 18094A2. Cluster Ib (orange box) contains 5 samples: 19034A, 18115A6_T6, 18114L1_T1, 18114L3_T3, and 18114L5_T5. Cluster II (green box) contains 7 samples: 18114A2_T2, 19035A_T1, 19035A_T2, 18114L4_T4, and 18094L3. The dendrogram shows that samples within each cluster have high correlation coefficients, while samples between clusters have lower correlation coefficients.

Cluster	Sample
Ia	19056A
	19014A
	19036A
	18106A
	18116A
	19054L_P
	19036L_P
	18124A
	19056A2
	18126A1
	18126A2
	19046A2
	19025A
	19044L_P
	19036A_P
	18114A
	19024A
	19016A1
	19016A2
	18105A
	18104A
	19054A
	18064A
	18082A
	19026A
	18096A
	18095A
	19054A_P
Ib	19034A
	18115A6_T6
	18114L1_T1
	18114L3_T3
	18114L5_T5
II	18114A2_T2
	19035A_T1
	19035A_T2
	18114L4_T4
	18094L3

Figure 2. Dendrogram obtained by cluster analysis of the percentage composition of the volatiles isolated from *C. japonica* essential oil samples, based on correlation and using unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA). For samples codes *vide* Table 1.



Centro de
Biotecnología
Vegetal

Tabela 3. Gama de variação percentual mínima e máxima dos componentes maioritários ($\geq 5\%$) identificados nos óleos essenciais de *C. japonica*. Para o conjunto de amostras agrupadas em cada cluster e sub-cluster, vide Figura 2.

Table 3. Minimum and maximum percentage range of main components ($\geq 5\%$) identified in *C. japonica* essential oils. For samples grouped on each of the clusters and sub-clusters vide Figure 2.

Componentes	Components	IR / RI	Cluster I				Cluster II	
			Cluster Ia		Cluster Ib		Min	Max
			Min	Max	Min	Max		
α -Pineno	α -Pinene	930	15.1	48.9	5.8	15.7	3.7	17.3
Sabineno	Sabinene	958	1.0	25.0	5.2	13.8	4.1	10.3
β -Mirceno	β -Myrcene	975	1.1	5.7	2.2	4.1	1.6	3.8
Limoneno	Limonene	1009	1.0	17.0	3.3	7.7	3.2	6.1
γ -Terpineno	γ -Terpinene	1035	0.5	4.4	1.8	5.2	1.7	3.8
Terpinen-4-ol	Terpinen-4-ol	1148	1.2	5.5	1.7	13.2	2.6	13.3
Elemol	Elemol	1530	1.1	10.6	6.1	18.7	6.2	9.9
β -Eudesmol	β -Eudesmol	1620	0.1	6.5	0.6	1.8	1.0	2.8
α -Eudesmol	α -Eudesmol	1634	T	6.6	0.9	2.7	1.0	3.6
NI 1	UI 1	1915	T	3.1	0.2	1.5	0.5	5.0
NI A'	UI A'	1915	T	5.8	t	0.9	0.1	1.0
Filocladeno*	Phyllocladene	2006	1.5	19.1	3.7	19.8	0.1	5.9
Caureno	Kaurene	2044	T	6.0	0.5	9.7	12.8	31.1
Rendimento (% v/v)	Yield (% v/w)		0.1	0.3	0.1	0.4	0.4	0.4

3. Referências

- Faria J. M. S., A. M. Rodrigues, I. Sena, C. Moiteiro, R. N. Bennett, M. Mota, A. C. Figueiredo (2016) Bioactivity of *Ruta graveolens* and *Satureja montana* essential oils on *Solanum tuberosum* hairy roots and *S. tuberosum* hairy roots with *Meloidogyne chitwoodi* co-cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 7452–7458.
- Faria J. M. S., P. Barbosa, R. N. Bennett, M. Mota, A. C. Figueiredo (2013) Bioactivity against *Bursaphelenchus xylophilus*: nematotoxics from essential oils, essential oils fractions and decoction waters. *Phytochemistry* 94: 220-228.
- Garcia G., A. Garcia, M. Gibernau, A. Bighelli, F. Tomi (2017) Chemical compositions of essential oils of five introduced conifers in Corsica. *Natural Product Research* 31: 1697-1703.
- Moiteiro C., T. Esteves, L. Ramalho, R. Rojas, S. Alvarez, S. Zacchino, H. Bragança (2013) Essential oil characterization of two Azorean *Cryptomeria japonica* populations and their bBiological evaluations. *Natural Product Communications* 8: 1785-1790.
- Nakagawa T., Q. Zhu, H. Ishikawa, K. Ohnuki, K. Kakino, N. Horiuchi, H. Shinotsuka, T. Naito, T. Matsumoto, N. Minamisawa, M. Yatagai, K. Shimizu (2016) Multiple uses of essential oil and by-products from various parts of the Yakushima Native Cedar (*Cryptomeria Japonica*). *Journal of Wood Chemistry and Technology* 36: 42-55.
- Pestana M.H. & J. N. Gageiro (2000) Análise de Dados para Ciências Sociais. A complementaridade do SPSS. Edições Sílabo, Lisboa, pp. 563.
- Rohlf J. F. (2000) NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics Inc., New York.

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.

Essential oil analysis - *Cryptomeria japonica* (Thunb. ex L.f.) D.Don

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

Abstract

This report includes the assessment of the chemical composition of *Cryptomeria japonica* essential oils, isolated from samples collected in May 2019, and the comparison of the chemical composition of the sixty essential oil samples analysed between May 2018 and May 2019. The report is organized into two separate sections, in Portuguese and in English, although Tables and Figures are simultaneously bilingual.

The essential oils chemical composition was analyzed by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS), and used in the determination of the correlation between the different samples based on cluster analysis.

1.1. *Cryptomeria japonica* analyzed samples

Between May 2018 and May 2019, sixty samples of *Cryptomeria japonica* (Thunb. ex L.f.) D.Don, (Cupressaceae) essential oils were received and analysed. The relation of samples, and sample types, included in this report are detailed in Table 1.

1.2. Analytical conditions

1.2.1. Essential oils

Essential oils were analysed by GC-MS for component identification, and by GC for component quantification, according to lab-methodology, as detailed in Faria *et al.* (2016).

1.2.1.1. Gas Chromatography (GC)

Gas chromatographic analyses were performed using a Perkin Elmer Clarus 400 gas chromatograph equipped with two flame ionization detectors (FIDs), a data handling system and a vaporizing injector port into which two columns of different polarities were installed: a DB-1 fused-silica column (100% Dimethylpolysiloxane, 30 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 µm; J & W Scientific Inc., Rancho Cordova, CA, USA) and a DB-17HT fused-silica column [(50% phenyl)-methylpolysiloxane, 30 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.15 µm; J & W Scientific Inc.]. Oven temperature was programmed, 45-175 °C, at 3 °C/min, subsequently at 15 °C/min up to 300 °C, and then held isothermal for 10 min; injector and detector temperatures, 280 °C and 300 °C, respectively; carrier gas, hydrogen, adjusted to a linear velocity of 30 cm/s. The samples were injected using split sampling technique, ratio 1:50. The volume of injection was 0.1 µL of a *n*-pentane-essential oil solution (1:1). The percentage composition of the volatiles were computed, by the normalization method from the GC peak areas, calculated as mean values of two injections, from each sample, without using the response factors.

1.2.1.2. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

The GC-MS unit consisted on a Perkin Elmer Clarus 600 gas chromatograph, equipped with DB-1 fused-silica column (30 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μ m; J & W Scientific, Inc.), and interfaced with a Perkin-Elmer 600T mass spectrometer (software version 5.4.2.1617, Perkin Elmer, Shelton, CT, USA). Injector and oven temperatures were as above; transfer line temperature, 280 °C; ion source temperature, 220°C; carrier gas, helium, adjusted to a linear velocity of 30 cm/s; split ratio, 1:40; ionization energy, 70 eV; scan range, 40-300 u; scan time, 1 s. The identity of the components was assigned by comparison of their retention indices, relative to C₉-C₃₀ *n*-alkane indices and GC-MS spectra from a lab-made library, created with reference essential oils, laboratory-synthesized components, laboratory isolated compounds and commercially available standards.

1.2.1.3. Statistical analysis

The percentage composition of propolis volatiles was used to determine the relationship between the different samples by cluster analysis using Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System (NTSYS PC software, version 2.2, Exeter Software) (Rohlf, 1992). For cluster analysis, correlation coefficient was selected as a measure of similarity among all samples, and the Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Averages (UPGMA) was used for cluster definition. The degree of correlation was evaluated according to Pestana and Gageiro (2000) in very high (0.90-1.0), high (0.70-0.89), moderate (0.40-0.69), low (0.20-0.39) and very low (<0.20).

2. Results and Discussion

2.1. Composition of the essential oils from samples collected in May 2019

Vide Figure 1 and Table 2 in section 2.1. Composição química dos óleos essenciais das amostras colhidas em maio 2019.

2.2. Comparison of the chemical composition from the samples collected between May 2018 and May 2019

C. japonica essential oil chemical composition was used in the determination of the correlation between samples using cluster analysis, showing two moderately chemically correlated clusters, cluster I and II, ($S_{cor} > 0.5$), Figura 2.

Cluster I included 56 samples, divided into two sub-clusters, Ia, with 50 samples, and Ib, with 6. These clusters are marked with blue and orange frames, respectively, in Figure 2. Cluster II, with green frame in Figure 2, included the remaining 4 samples, which were characterized by showing higher kaurene levels (13-31%), Table 3. Cluster I included samples with higher phyllocladane content (2-20%), but it separates into two sub-clusters, mostly due to the difference in α -pinene percentage (cluster Ia 15-49%, cluster Ib 6-16%), Table 3.

No particular grouping was observed on the dendrogram, Figure 2, based on altitude. Samples with male and female strobili were mostly grouped in one sub-cluster of sub-cluster Ia, as shown in Figure 2, but all these samples are chemically highly correlated with the remaining samples of the same sub-cluster ($S_{cor} > 0.9$).

Sub-cluster Ib, with the exception of one sample, gathered essential oils obtained by hydrodistillation (which run with some technical problems), from younger material (2 to 3 years), Table 1, than the remaining (wood with average age above 30 years) and which were extracted by steam-distillation.

The comparison of the main essential oil components from the sixty analyzed samples with data from literature collected in Azores (Moiteiro *et al.* 2013, Faria *et al.* 2013), Corsica (França) (Garcia *et al.* 2017) and Japan (Nakagawa *et al.* 2016), showed a similar pattern of main components, when similar plant parts are compared. Nevertheless, not all published studies used the same time of distillation, or distillation type, which may affect essential oil composition.

3. References

Vide section 3. Referências.

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

CQB

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: Ilha de São Miguel: Achadinha, Achada, Santo António, Nordeste; Lomba de São Pedro, Coroa da Mata, Ribeirinha, Pasto Comprido da Pacheca, Lomba da Maia, Ribeira Grande; Cumeeiras, Sete Cidades, Espigão Água de Pau, Lagoa. Açores.

Ilha do Pico: Prainha, Pico, São Roque do Pico. Açores.

Ilha da Terceira: Três Cantos, Terra Chã, Viveiro Florestal da Falca, S. Bartolomeu; Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo; Encosta do Pico, Agualva; Encosta dos Altares, Praia da Vitória. Açores, Portugal.

Tipo de mata: Cultivo e espontâneo (Mata 30 a 50 anos e mata juvenil 2 a 3 anos)

Ano / mês de recolha: 2018 / 05 a 2019 / 05

Cota: 2; 4; 5 e 6

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

Parte da planta: parte aérea; ramadas e bicadas (RB+estróbilos)

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

Amostra: 62 óleos essenciais (OEs)

1. Procedimentos e condições de análise por ^{13}C NMR

Na preparação da amostra, cada OE (60 a 70 mg) foi dissolvido em clorofórmio deuterado (0,5 mL) e usou-se como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os desvios químicos (δ) são dados em ppm relativamente ao TMS.

Na análise qualitativa das amostras de OEs utilizou-se um espectrómetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de marca Bruker Advance 400 MHz, operando a uma frequência de carbono a 100,61 MHz, equipado com uma sonda de 5mm QNP e as análises foram realizadas à temperatura ambiente. Os espectros de ^{13}C NMR foram adquiridos usando os seguintes parâmetros: largura de espectro 23,98 KHz com desacoplamento de próton, largura de pulso de ^{13}C de 9,0 μs , tempo de relaxação entre cada aquisição (D1) 1,366 s, “line broadening” 1,0 Hz, para 64 “data points”. Na experiência de ^{13}C APT cada espectro resulta da acumulação 4k (nº de scans 4k ou 4096) e os limites da janela entre +219 e -19 ppm. A atribuição dos deslocamentos de cada pico foi efetuada por comparação com os espectros dos picos de amostras padrão adquiridos ou isolados a partir da planta (sabineno, α -pineno, limoneno, mirceno, canfeno, terpinen-4-ol, α - e β -terpineno, elemol, eudesmol, acetato de bornilo, filocladeno e *ent*-caureno) obtidos nas mesmas condições das amostras.

2. Análise comparativa dos perfis químicos das amostras das Ilhas dos Açores

No início do projeto, foram analisadas oito amostras de óleos essenciais (OEs) de *C. japonica* representativas do mês de maio de 2018, fornecidas pela Azorina S.A., da Achadinha (cota 6 e Andossolo), do Nordeste da ilha de São Miguel. Pretendeu-se deste modo avaliar as condições de extração de OE em função do processamento das amostras (RB estilhada e RB não estilhada) e o tempo de destilação. Dos resultados desta primeira análise, decidiu-se que ao longo do projeto iriam ser extraídas, por arrastamento de vapor, amostras de ramas e bicadas com estórbilos (RB) não estilhadas durante duas horas.

O perfil químico de ^{13}C RMN das oito amostras de OEs do primeiro mês (1º lote) foi semelhante. Da análise comparativa dos espectros dos OEs de criptoméria com amostras padrão, verifica-se que todas as amostras contêm maioritariamente compostos do tipo hidrocarbonetos monoterpénicos, α -pineno e sabineno, que constituem ca. de 50% da percentagem total do óleo essencial. Outros compostos voláteis como β -mirceno, canfeno, limoneno, e α - e β -terpineno foram também detetados em menores percentagens, seguidos de compostos oxigenados como terpinen-4-ol, elemol, acetato de bornilo, entre outros, mas em quantidades muito reduzidas. Surgem também diterpenos como filocladeno e *ent*-caureno em quantidades variáveis.

Neste relatório anual começou-se por avaliar a composição química dos OEs da ilha de São Miguel por latitude e tipo de solo, uma vez que mais de metade das amostras fornecidas pela Azorina S.A. são oriundas de diferentes regiões com altitudes variáveis (cotas 6, 4, 5 e 2) da ilha de São Miguel e produzidas por arrastamento de vapor na mesma ilha.

No que respeita às amostras de OEs da Ilha do Pico, foram analisadas seis amostras de março a maio de 2019, provenientes de RB provenientes da região da Prainha de andossolos e litossolos de cota 4 e 6, extraídas por arrastamento de vapor na mesma ilha.

Da Ilha Terceira foram analisadas oito amostras de OEs por *Clevenger* e uma amostra de OE por arrastamento de vapor, na ilha do Pico, de diferentes épocas ao longo do ano. Estas amostras são de diferentes regiões da ilha e diferenciaram-se pelo tipo de solo e cota (4 e 5).

No que respeita às amostras de OEs da Achadinha e Achada, Northeast, ilha de São Miguel da cota 6 (6A1 e 6A2), os constituintes maioritários são, α -pineno e sabineno, seguido de filocladeno com baixos conteúdos de *ent*-caureno. Ao longo do ano a variação é mais significativa nos constituintes maioritários. A percentagem de α -pineno é muito variável, observando-se valores mais elevados em fevereiro de 2019 e semelhantes ao detetado no início do estudo em maio de 2018 e uma diminuição acentuada nos meses de outubro e novembro de 2018, março e maio de 2019. Esta variação poderá estar associada a uma oscilação dos valores de temperatura nestes últimos meses. Adicionalmente, no mês de novembro de 2018, quando a percentagem de α -pineno e sabineno é mínima atinge-se um máximo do diterpeno, filocladeno. No que respeita ao *ent*-caureno a sua presença é residual. A quantidade de limoneno nestas amostras mantém-se pouco variável. A variação da percentagem de cada constituinte dos OEs da Achadinha e Achada (locais próximos) do mesmo mês não é significativa, à exceção dos meses de março, abril e maio de 2019, em que o α -pineno e o filocladeno apresentam uma ligeira variação.

No que respeita às nove amostras de OEs, da cota 4 (4A), da ilha de São Miguel (Lagoa, Ribeira

Grande e Sete Cidades), também apresentam oscilações semelhantes às amostras da cota 6 (6A1 e 6A2), com quantidades elevadas de α -pineno, surgindo um mínimo em janeiro e março de 2019. O filocladeno apresenta um aumento ao longo dos meses analisados com uma diminuição acentuada no mês de maio de 2019, muito próximo do valor obtido em maio de 2018. Contudo, deve salientar-se que as amostras que apresentam maior quantidade de filocladeno são provenientes das Cumeeiras, Sete Cidades.

As três amostras de OEs da cota 5 (5A) do Nordeste (Santo António) e Ribeira Grande (Lomba da Maia) têm como compostos maioritários, α -pineno e sabineno, estando este último presente em menores quantidades do que o usual nos OEs das cotas 4 e 6. Quando comparadas as três amostras, os monoterpenos, α -pineno e limoneno, não apresentam grande variação, enquanto que a quantidade de sabineno aumenta gradualmente. Observa-se um aumento de filocladeno e simultaneamente uma diminuição de *ent*-caureno.

As três amostras de OEs da cota 2 (2A) da Ribeira Grande (junho a agosto) são constituídas maioritariamente por α -pineno e reduzidas percentagens de diterpenos, quando comparada com as outras amostras de diferentes cotas e regiões de São Miguel.

A análise comparativa das amostras de OEs do mês de junho de 2018, onde no mesmo mês foram analisadas amostras da cota 2A, 4A e 6A, foi possível comprovar as diferenças existentes no perfil químico dos OEs das amostras das três cotas. Como descrito anteriormente, o OE de cota 2A tem uma quantidade de α -pineno superior aos OEs de cota 4A e 6A contudo o OE de cota 6A apresenta maior percentagem de sabineno, limoneno e filocladeno comparativamente com os OEs de cota 2A e 4A do mês de junho, como se pode observar pelos perfis dos espectros de ^{13}C NMR da Figura 2.1 (anexo).

As seis amostras de OEs da ilha do Pico, referentes a três meses, março a maio de 2019, são provenientes de dois tipos de solo, de cota 4 e 6 da Prainha do Pico.

As amostras provenientes de cota 4 de litossolos (4LP) do mês abril e maio são constituídas maioritariamente por α -pineno e sabineno, tendo a quantidade do primeiro aumentado e a do segundo diminuído ao longo dos dois meses. Observa-se que a quantidade de limoneno é expressiva e superior às amostras de São Miguel. A quantidade de filocladeno é reduzida com vestígios de *ent*-caureno.

As amostras provenientes de andossolos (4AP) do mês abril e maio, são também constituídas maioritariamente por α -pineno e sabineno, em que o primeiro não apresenta grande variação enquanto que o segundo aumenta consideravelmente. A quantidade de filocladeno é baixa, mas constante ao longo dos dois meses com vestígios de *ent*-caureno. A amostra do mês de abril (OE 19044AP) apresenta uma quantidade de limoneno superior a todas as amostras já analisadas, diminuindo ligeiramente no mês seguinte.

Contudo, é de salientar que o conteúdo em limoneno presente nas amostras 4AP é superior comparativamente às amostras de OEs provenientes de S. Miguel, como já aconteceu com as amostras 4LP.

O perfil químico das duas amostras de OEs da cota 6 da ilha do Pico (Cais, Praia) de solos diferentes, andossolos (6AP) e litossolos (6LP), é muito semelhante. À semelhança dos OEs da ilha de São Miguel, as duas amostras de OEs da ilha do Pico (19036AP e 19036LP) são constituídas maioritariamente por α -pineno, sabineno, filocladeno e limoneno, seguindo-se em menores percentagens, β -mirceno, elemol, terpinen-4-ol, acetato de bornilo, α - e γ -terpineno, com *ent*-caureno praticamente inexistente. À semelhança das amostras anteriores da ilha do Pico de cota 4 (4AP e 4LP) é de salientar que a quantidade de limoneno é significativa.

Das 9 amostras de OEs da ilha Terceira, oito foram obtidas por *Clevenger* e uma obtida por

arrastamento de vapor destilada na ilha do Pico. A primeira amostra, 4L3, de setembro de 2018 proveniente de Angra do Heroísmo (Veredas, Terra Chã) diferenciou-se de todas as amostras das outras ilhas, sendo constituída maioritariamente por *ent*-caureno, terpinen-4-ol e elemol seguida de menores quantidades de α -pineno, sabineno, filocladeno, terpinenos e limoneno.

No mês de novembro de 2018 foram enviadas seis amostras de OEs da Ilha Terceira, obtidas por *Clevenger*, quatro delas provenientes de litossolos, da cota 4, de cultivo e por regeneração natural (4L1, 4L3, 4L4 e 4L5) e duas de andossolos das cotas 4 e 5, de cultivo e regeneração natural (4A2 e 5A6).

O OE (18114L1) de RB de cultivo da região de Três Cantos, Terra Chã, apresenta uma grande percentagem de filocladeno e terpinen-4-ol seguido de α -pineno e limoneno em menores percentagens. Neste OE deteta-se ainda elemol, isómeros de eudesmol, acetato de bornilo, mirceno, α - e β -terpineno, sandacopamaradieno e vestígios de sabineno e *ent*-caureno.

Os OEs (18114L3 e 18114L4) provenientes de RB de plantas juvenis e espontânea, de Veredas, Terra Chã, cujos OEs variam no tempo entre a coleta e a hidrodestilação, apresentam uma variação significativa na percentagem dos seus constituintes. O OE 18114L3 (extraído 4 dias após a coleta), é constituído por filocladeno, *ent*-caureno, com o primeiro em maior percentagem relativamente ao segundo, seguido de elemol, eudesmol, terpinen-4-ol, limoneno, sandaracopamaradieno, mirceno, α - e β -terpineno, e reduzidas quantidades de α -pineno e sabineno. O OE 18114L4 (extraído 6 dias após a coleta), é constituído maioritariamente por *ent*-caureno seguido de terpinen-4-ol, limoneno, elemol, sabineno e vestígios de filocladeno. O perfil do OE 18114L5 (extraído após a coleta de RB cultivadas), de Veredas, Terra Chã, é semelhante ao do OE 18114L3. Assim, o OE 18114L5 é rico em elemol, filocladeno, *ent*-caureno, limoneno e terpinen-4-ol, com baixa percentagem de α -pineno e sabineno.

No que respeita aos OEs da Ilha Terceira de andossolos, são oriundos de RB de plantas juvenis de viveiro florestal da Falca, de cota 4, OE 18114A2 e de RB de mata espontânea de ca. de 30 anos da Praia da Vitória, de cota de 5, OE 18115A6.

O OE 18114A2 apresenta baixas quantidades de diterpenos, *ent*-caureno e filocladeno, sendo este último praticamente metade do primeiro. A percentagem de α -pineno e sabineno, comparativamente com os outros óleos de São Miguel é baixa, com o sabineno quase inexistente. À semelhança dos OEs da Ilha Terceira, este OE é ainda constituído por uma quantidade razoável de terpinen-4-ol, elemol e limoneno, para além dos isómeros de eudesmol, sandaracopamaradieno, mirceno, isómeros de terpinenos e acetato de bornilo.

Contrariamente ao OE 18114A2, o OE 18115A6 apresenta uma grande quantidade de filocladeno não existindo *ent*-caureno. Deteta-se também sabineno e α -pineno, com conteúdos semelhantes, enquanto que terpinen-4-ol, elemol e limoneno, apresentam estar também em quantidade muito idênticas, sendo os restantes constituintes vestigiais.

As duas amostras de OEs da ilha Terceira, oriundas da cota 5, da Praia da Vitória, obtidos por processos de extração diferentes, apresentam a mesma composição química, mas com percentagens dos seus constituintes variável. O OE 19035AT1 obtido por *Clevenger*, tem como constituinte maioritário o *ent*-caureno seguido de α -pineno e elemol, não se detetando filocladeno, seguindo-se em percentagens muito semelhantes, mas ainda consideráveis (ca. de 5%), sabineno, limoneno, terpinen-4-ol e em quantidades reduzidas β -mirceno, α - e γ -terpineno, canfeno e acetato de bornilo.

O OE extraído por destilação por arrastamento de vapor (OE 19035AT2), foi comparado com o OE 19035AT1 (*Clevenger*), e observou-se que o OE 19035AT2 apresenta maior percentagem de α -pineno e

sabineno, sendo este último constituinte em menor percentagem do que o usual para estes OEs de criptoméria. A percentagem de limoneno aumentou ligeiramente. Contrariamente ao OE 19035AT1, o OE 19035AT2 apresenta filocladeno e um novo diterpeno desconhecido, com diminuição das percentagens de *ent*-caureno, elemol e terpinen-4-ol.

3. Conclusão

As amostras de São Miguel, independentemente do tipo de solo, altitude e região, são constituídas maioritariamente por α -pineno e sabineno, seguido de menores quantidades de filocladeno e limoneno com vestígios de *ent*-caureno. A maior quantidade de filocladeno foi detetada em amostras provenientes das Cumeeiras, Sete Cidades (4A).

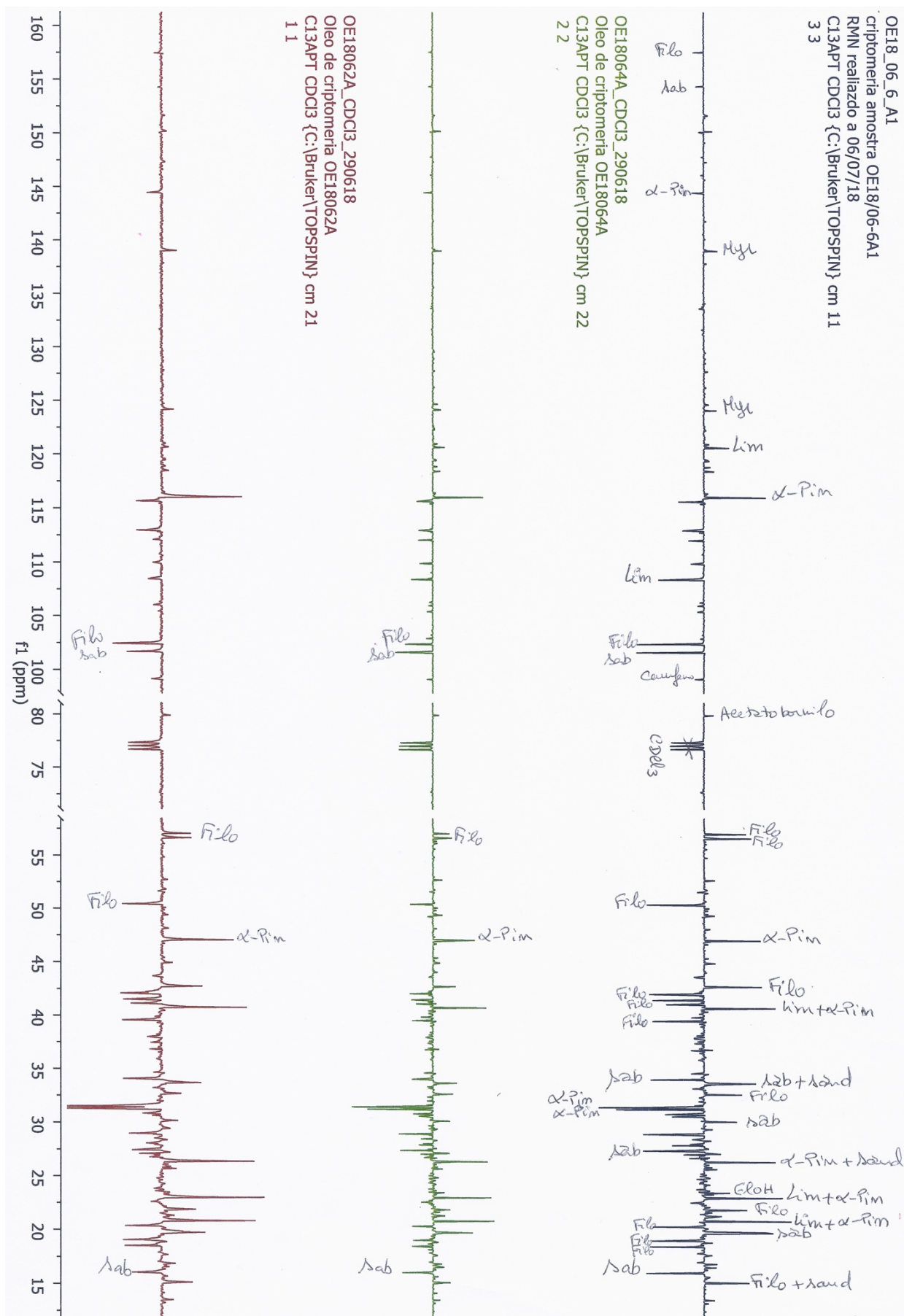
O perfil químico das amostras do Pico é semelhante ao de São Miguel, com elevadas quantidades de α -pineno e sabineno e com quantidades de limoneno significativamente superior às amostras de São Miguel.

As análises das amostras de OEs enviadas pela Azorina S.A. da Ilha terceira não foram conclusivas, tendo em conta a periodicidade e o número de amostras, assim como os vários parâmetros considerados (idade da planta, germinação espontânea/cultivo, método de extração, cota, tipo de solo, etc.). Assim, não foi possível fazer uma relação entre o perfil químico e cada parâmetro considerado.

Contudo, estes OEs oriundos de diversas regiões da Terceira de época diferentes do ano e solos diferentes, diferenciam-se dos OEs das ilhas de São Miguel e do Pico devido à reduzida quantidade de α -pineno e sabineno e maior expressão de uma maior variedade de compostos oxigenados, como terpinen-4-ol, elemol e isómeros de eudesmol. Contrariamente aos OEs das outras ilhas, em algumas amostras desta ilha surgem OEs ricos em *ent*-caureno.

Anexo

Figura 2.1. Espectros de ^{13}C APT RMN dos OEs 1806A1, 18064A e 18062A do mês de junho 2018 e cotas diferentes em CDCl_3 . Correspondência dos compostos: α -pin- α -Pineno; Myr- β -Mirceno; Filo- Filocladeno; Sab- Sabineno; Lim- Limoneno; canfeno; Acetato de bornilo.



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: São Miguel Island: (Achadinha, Achada, Santo António, Northeast; Lomba de São Pedro, Coroa da Mata, Ribeirinha, Pasto Comprido da Pacheca, Lomba da Maia, Ribeira Grande; Cumeeiras, Sete Cidades, Espigão Água de Pau, Lagoa. Azores. Pico Island: (Praia, Pico, São Roque do Pico). Azores.

Terceira Island: (Três Cantos, Terra Chã; Viveiro Florestal da Falca, S. Bartolomeu; Veredas, Terra Chã; Angra do Heroísmo; Encosta do Pico, Agualva; Encosta dos Altares, Praia da Vitória), Azores, Portugal.

Type of forest: Cultivar, spontaneous (Wood 30 to 50 years and juvenile 2 to 3 years)

Production Year / production month: 2018 / 05 – 2019 / 05

Quota: 2; 4; 5 e 6

Types of soils: Andosol (A) and Lithosol (L)

Part of plant: Aerial parts - uncut landscaping with strobili (RB)

Extraction procedure: Steam-distillation and *Clevenger* apparatus

Sample: 62 Essential Oils (EOs)

1. ^{13}C NMR procedures and analysis conditions

The EO (60 to 70 mg) was dissolved in deuteriochloroform (0.5 mL) and all chemical shift values given in ppm (δ) using tetramethylsilane (TMS) as internal standard.

^{13}C APT NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400 spectrometer operating at 100.61 MHz, equipped with a 5 mm QNP probe at room temperature. ^{13}C APT NMR spectra were recorded using the following parameters: spectral width 23.98 kHz under low-power proton decoupling and ^{13}C pulse width of 9.0 μs , 2.0 s relaxation delay (D1) between scans, acquisition time 1.366 s, line broadening 1.0 Hz, for 64 k data points. An APT experiment from the Bruker library was used with 4 k accumulated scans and the plot limits were +219 to -19 ppm. Chemical shifts and peak attributions of ^{13}C APT NMR spectra were made by comparison of standard (sabinene, α -pinene, camphene, myrcene, limonene, terpinene isomers, terpinen-4-ol, bornyl acetate, elemol, eudesmol, phyllocladene and *ent*-kaurene).

2. Comparative analysis of chemical profiles of the *C. japonica* samples from Azores Islands

This project started in May of 2018, with the analysis of eight samples of *C. japonica* provided by Azorina S.A. from Achadinha (quota 6 and Andosols, Northeast, São Miguel Island). Different processing conditions of sample (cut and uncut landscaping with strobili) and extraction time of EOs were firstly explored. Analysis of the results, it was decided that in the project it be used samples of uncut branches from landscaping with strobili (RB) were steam-extracted during two hours.

The first eight samples of EOs (first batch) showed a similar ^{13}C RMN chemical profile. All EOs were mostly composed (ca. de 50%) by monoterpenes such as α -pinene and sabinene. Another volatile compounds (myrcene, camphene, limonene e α - e β -terpinene) were found in lower quantities and terpinen-4-ol, elemol, bornyl acetate, among others oxygenated compounds were also detected but in minor quantities. Phyllocladene and *ent*-kaurene diterpenes were also constituents of these EOs.

Firstly, in this annual report, the chemical profile of EOs, from São Miguel Island, produced by steam-distillation were evaluated. The samples were grouped by altitude (quota 2, 4, 5 and 6) and the variation of monoterpenes and diterpenes content were evaluated.

Six EOs from Pico Island (March to May of 2019) different soils and latitude (quota 4 and 6) were collected in Prainha region and produced locally by steam-distillation.

From Terceira Island, eight samples of EOs obtained from *Clevenger* apparatus and one sample obtained from steam distillation were evaluated. The EO from steam distillation was produced in Pico island. These samples were from different regions, soils type and altitude (quotas 4 and 5).

Regarding to samples of EOs from Achadinha and Achada, Northeast, São Miguel of quota 6 (6A1 and 6A2), the main constituents of EOs were α -pinene and sabinene followed by phyllocladene and lower quantities of *ent*-kaurene. During this year of project, the variation in chemical profile of EOS were more significant in monoterpene content. The amount of α -pinene was very variable being observed the higher values in May of 2018 and February of 2019. In October and November of 2018, a first drop of this monoterpene was observed in March and April of 2019 and the same tendency occurred. This variation may be associated to an oscillation of the temperature values in these months. In addition, in November of 2018, when α -pinene and sabinene quantities were minimal, a maximum of the phyllocladene is reached. The presence of *ent*-kaurene in all samples were residual and limonene and others constituents remains slightly variable. The variation of each constituent of Achadinha and Achada EOs of the same batch is not significant, except for the months of March, April and May of 2019, where α -pinene and phyllocladene present a slight variation.

In the nine samples of EOs of quota 4 (4A), from São Miguel Island (Lagoa, Ribeira Grande and Sete Cidades) the same pattern of quota 6 (6A1 and 6A2) samples were observed. In this EOs (4A), high and variable values of α -pinene (minimum amount in January and March of 2019) were found. Regarding to phyllocladene content there was an increase during the year with a drastic drop in May of 2019 reaching similar values to May of 2018. However, the EOs from Cumeeiras, Sete Cidades have higher values of phyllocladene.

Relatively to the three samples from quota 5 (5A) of Northeast (Santo António) and Ribeira Grande (Lomba da Maia), α -pinene and sabinene were the major constituents, however the sabinene content was

lower than the one present in EOs from quota 4 and 6. In monoterpene constituents (α -pinene and limonene) no variation was observed in this three EOs, however an increasing of sabinene were verified. Finally, the phyllocladene constituent increase while *ent*-kaurene decrease.

In three samples of EOs from quota 2A of Ribeira Grande (June to August) were identify large contents of the α -pinene and reduction of diterpenes when compared with other samples from São Miguel Island.

In June of 2018, has become possible to analyse EOs arising from different altitudes (quotas 2A, 4A, 6A) in the same month it became possible to highlight the differences in EOs chemical profile arise from different latitudes. As described, the α -pinene amount was significantly higher in EOs from 2A than EOs from 4A and 6A quotas, however in EO from 6A the sabinene, limonene and phyllocladene amounts were higher than other EOs (Figure 1, Annex).

The six EOs from Pico island (Prainha of Pico) were provided from quotas 4A, 6A and 4L, 6L in March to May of 2019.

The samples 4LP from April and May contains mostly α -pinene and sabinene. During these two months the α -pinene increase while the sabinene contents had the opposite tendency. Additionally, in this EOs were observed an expressive quantity of limonene, (higher than São Miguel Island samples) while phyllocladene content was reduced and only residual quantities of *ent*-kaurene was presented.

EOs 4AP from April and May of 2019, α -pinene and sabinene were the main constituents. No variation of α -pinene was observed while sabinene content increased considerably. Relatively to phyllocladene, the amount of this diterpene is reduced and constant during these two months while *ent*-kaurene was expressed in residual quantities. The sample OE 19044AP showed the higher quantity of limonene, comparing to all other samples analysed, decreasing slightly in May. Nevertheless, the EOs 4AP contains more limonene than EO's from São Miguel Island, such as 4LP EOs.

EOs, from different types of soils (6AP and 6LP) and same latitude (quota 6) of the Pico Island (Cais, Praia), were similar. As the OEs from São Miguel Island, this two samples (19036AP and 19036LP) were mostly α -pinene, sabinene, phyllocladene and limonene, followed by β -myrcene, elemol, terpinen-4-ol, bornyl acetate, α - and γ -terpinene in lower quantities, with residues of *ent*-kaurene. Similar to EOs from quota 4 of Pico Island (4AP and 4LP) these samples contained expressive amount of limonene.

From Terceira Island were analysed nine EOs, eight were obtained through *Clevenger* apparatus at Terceira and the remaining one by steam-distillation at Pico Island. The first sample analysed (4L3, September of 2018) from Angra do Heroísmo (Veredas, Terra Chã) were different compared with EOs of other Islands. In this sample was mostly detected *ent*-kaurene, terpinen-4-ol and elemol and small quantities of α -pinene, sabinene, phyllocladene, terpinenes and limonene.

In November of 2018, six samples of EOs (4 samples from lithosol, 4 latitudes [quotas 4L1, 4L3, 4L4 and 4L5] and 2 samples from andosol, 4 and 5 latitudes (quotas 4A2 and 5A6)) obtained by *Clevenger* Apparatus, from Terceira Island were sent by Azorina S.A..

The EO (18114L1) from cultivar (Três Cantos, Terra Chã), showed high quantities of phyllocladene and terpinen-4-ol followed by α -pinene and limonene in lower quantities. Additionally, elemol, eudesmoles, bornyl acetate, myrcene, α - and β -terpinene, and residues of sabinene and *ent*-kaurene were found.

EOs (18114L3 e 18114L4) from spontaneous juvenile plants (Veredas, Terra Chã), with different temporal distance between collect and hydrodistillation, showed a significant variation in their constituent's

percentage. The EO 18114L3 (extracted 4 days after collect), exhibited large amounts of phyllocladene followed by *ent*-Kaurene, eudesmol, terpinen-4-ol, limonene, sandaracopamaradiene, myrcene, α - and β -terpinene and reduce quantities of α -pinene and sabinene. The EO 18114L4 (extracted 6 days after collect), had mostly, in its constitution, *ent*-Kaurene followed by terpinen-4-ol, limonene, elemol, sabinene and residues of phyllocladene. The chemical profile of EO 18114L5 (extracted immediately after branches collected from cultivar plants located in Veredas, Terra Chã) was analogous to EO 18114L3. Thus, EO 18114L5 contains high quantities of elemol, phyllocladene, *ent*-kaurene, limonene and terpinen-4-ol, with low quantities of α -pinene and sabinene.

The EOs, 18114A2 and 18115A6 from andosols Terceira Island were provided from juvenile (ca. 2 -3 years old) *RB* of the Falca nursery, quota 4, and the *RB* from naturalness woods (ca. 30 years of the Praia da Vitória), quota 5, respectively.

The EO 18114A2 have the small amounts of *ent*-kaurene and phyllocladene, being the latter about half of the first. The α -pinene and sabinene amount was diminish in comparison with other EOs from São Miguel with traces of sabinene. Just like EOs from Terceira Island, OE 18114A2 also contains a reasonable quantity of terpinen-4-ol, elemol and limonene, and also eudesmol isomers, sandaracopamaradiene, myrcene, α -cadinol, terpinenos and bornyl acetate.

In contrast with EO 18114A2, the EO 18115A6 have a high content of phyllocladene but no *ent*-kaurene occurred in this EO. Also, the amounts of sabinene, α -pinene, terpinen-4-ol and elemol, were similar being vestigial the remaining constituents.

The two EOs samples of Terceira Island from Praia da Vitória of the 5 quota, obtained from different methods of extraction have similar chemical profiles, however the content of each component suffer variation. Then, the EO 19035AT1 from *Clevenger* have the *ent*-caurene as a main constituent followed of α -pinene and elemol. In similar amounts (ca. de 5% each) of sabinene, limonene, and terpinen-4-ol were also detected while myrcene, terpinene isomers, camphene, bornyl acetate were vestigial quantities; phyllocladene was not detect in this EO.

Comparison between OE 19035AT2, from steam-extraction distillation, and EO 19035AT1, can be seen that the first EO (19035AT2) contains higher α -pinene and sabinene, being the latest in smallest percentage than usual for cryptomeria OEs. The limonene content slightly increased. Contrarily of EO 19035AT1, the EO 19035AT2 have phyllocladene together an unknown diterpene, and a decrease of the *ent*-caurene, elemol and terpinen-4-ol.

1. Conclusions

Independently of soil type (Andosol and Lithosol), latitude and region, the EO samples from São Miguel Island are mainly constituted for α -pinene and sabinene followed of minor amounts of phyllocladene and limonene, with traces of *ent*-kaurene. The large amount of the phyllocladene was detected from Cumeeiras, Sete Cidades samples (A4).

The chemical profile of EO samples from Pico Island is similar to the São Miguel Island. Pico Island samples contain abundant contents of α -pinene and sabinene although, the limonene content is significantly higher than the São Miguel samples.

The analysis of chemical profile of EO samples from Terceira Island was not conclusive. The highest number of parameters selected in the collection of branches from landscaping (such as, age of plants, cultivate

or spontaneous plants, extraction method, quote, soil type, etc.) together with the low periodicity and the number of EO samples received, did not allowed evaluated a chemical profile *versus* parameter relationship.

However, the Terceira Island EOs, from different regions, season of year, and soils, have lower contents of α -pinene and sabinene and have greater expression of oxygenated compounds than EOs from São Miguel Island. Terpinen-4-ol, elemol, and eudesmole isomers were the main oxygenated compounds detected in EOs of Terceira Island. Contrarily to the EOs of the other Islands, these EOs are enriched in *ent*-kaurene.

Annex

Figure 2.1. See Page 19

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