

Relatório no âmbito do projeto

Report on project

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

Junho, 2018

June, 2018



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 / Essential oil analysis - <i>Cryptomeria japonica</i> (Thunb. ex L.f.) D.Don	1
Análise por Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)	1
Analysis by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS)	1
 CQB	 5
Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (^{13}C RMN)	5
Analysis by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^{13}C NMR)	10

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	Maio de 2018 / May 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	Achadinha, Nordeste, Açores, Portugal
Cultivo, Espontânea / Cultivation, Wild harvest	Mata com ± 50 anos / Wood with ± 50 years
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 Maio 2018.

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

<i>Cryptomeria japonica</i> (L. fil.) D. Don				Óleo Essencial / Essential Oil		
Tipo de material	Sample type			Tempo de destilação Distillation time (h:min)	Rendimento Yield (%, v/p)	Código Code
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	1:00	0.22	18056A1
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	1:30	0.22	18056A2
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	2:00	0.22	18056A3
Ramadas e bicadas	Lote não estilhado	Branches from landscaping	Non-woodchips	2:30	0.22	18056A4
Ramadas e bicadas	Lote estilhado (2h)	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	0:25	0.31	18056A5
Ramadas e bicadas	Lote estilhado (2h)	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	0:55	0.31	18056A6
Ramadas e bicadas	Lote estilhado (2h)	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	1:25	0.31	18056A7
Ramadas e bicadas	Lote estilhado (2h)	Branches from landscaping	Woodchips (2h)	1:55	0.31	18056A8

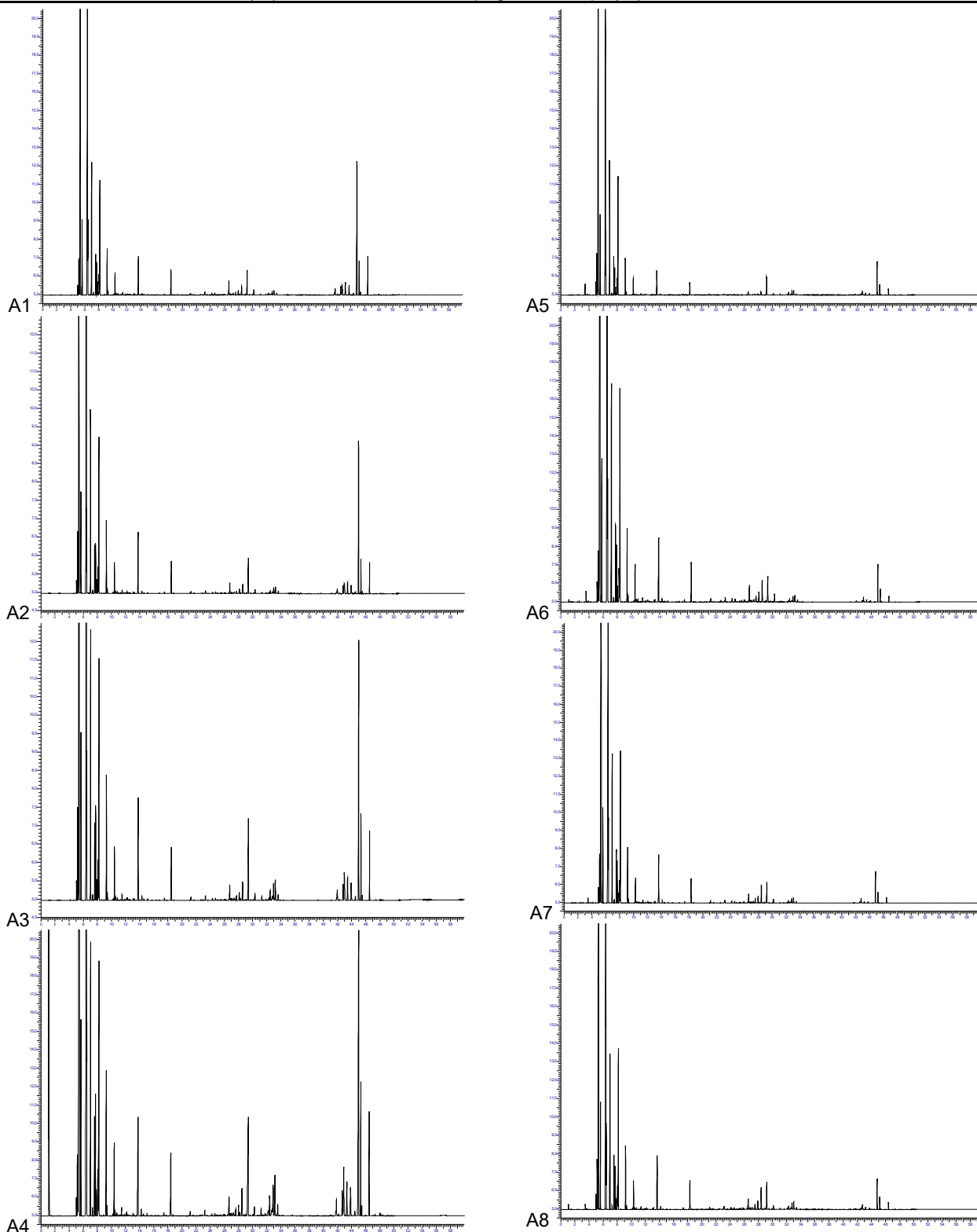


Fig. 1. Perfis cromatográficos das amostras analisadas. / **Fig. 1.** Gas chromatography profiles, taken on the DB-1 column, of the essential oils isolated from *Cryptomeria japonica* samples (for sample codes, see Table 1).

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

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

Componentes	Components	IR / RI	18056 A1	18056 A2	18056 A3	18056 A4	18056 A5	18056 A6	18056 A7	18056 A8
Triciclono	Tricyclene	921	0.2	0.3	0.2	0.1	0.6	0.4	0.7	0.5
α -Tujeno	α -Thujene	924	1.4	1.6	1.6	1.5	1.9	1.8	1.8	1.8
α -Pino	α -Pinene	930	35.1	35.0	31.3	28.1	42.6	42.0	41.2	41.3
Canfeno	Camphene	938	2.0	2.4	2.3	2.2	2.7	2.6	2.6	2.6
Sabineno	Sabinene	958	22.8	25.0	22.2	19.5	24.1	21.3	20.3	19.7
β -Pino	β -Pinene	963	2.3	2.5	2.2	2.0	2.5	2.1	2.0	2.0
β -Mirreno	β -Myrcene	975	4.4	4.9	4.7	4.4	5.5	5.4	5.2	5.2
α -Felandreno	α -Phellandrene	995	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
δ -3-Careno	δ -3-Carene	1000	1.3	1.3	1.2	1.1	1.5	1.6	1.6	1.6
α -Terpineno	α -Terpinene	1002	1.0	1.4	1.5	1.6	1.0	1.1	1.2	1.3
<i>p</i> -Cimeno	<i>p</i> -Cymene	1003	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
β -Felandreno	β -Phellandrene	1005	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.8	0.8	0.8
Limoneno	Limonene	1009	4.1	4.7	4.6	4.4	5.5	5.9	5.8	5.8
<i>cis</i> - β -Ocimeno	<i>cis</i> - β -Ocimene	1017	t	t	t	t	t	t	t	t
<i>trans</i> - β -Ocimeno	<i>trans</i> - β -Ocimene	1027	t	t	t	t	t	t	t	t
γ -Terpineno	γ -Terpinene	1035	1.6	2.2	2.4	2.5	1.5	1.7	1.9	2.0
Hidrato de <i>trans</i> -sabineno	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1037	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2,5-Dimetil estireno	2,5-Dimethyl styrene	1059	t	t	t	t	t	t	t	t
Terpinoleno	Terpinolene	1064	0.8	1.0	1.0	1.0	0.8	0.9	0.8	0.9
Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1066	0.1	0.1	0.1	t	0.1	0.1	0.1	t
Linalol	Linalool	1074	0.1	t	t	t	t	t	t	t
Acetato de 1-octen-3-ilo	1-Octen-3-yl acetate	1086	t	t	t	t	t	t	t	t
<i>trans</i> - <i>p</i> -2-Menten-1-ol	<i>trans</i> - <i>p</i> -2-Menthen-1-ol	1099	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Cânfora	Camphor	1102	t	t	t	t	t	t	t	t
<i>cis</i> - <i>p</i> -2-Menten-1-ol	<i>cis</i> - <i>p</i> -2-Menthen-1-ol	1114	t	t	t	t	t	t	t	t
Borneol	Borneol	1134	0.1	t	t	t	t	t	t	t
Terpinen-4-ol	Terpinen-4-ol	1148	1.8	2.3	2.6	2.7	1.3	2.2	2.4	2.4
α -Terpineol	α -Terpineol	1159	0.1	0.1	0.1	0.1	t	0.1	0.1	0.1
Acetato de α -fenchilo	α -Fenchyl acetate	1200	t	t	t	t	t	t	t	t
Acetato de linalilo	Linalyl acetate	1245	0.1	t	t	t	t	0.1	t	t
Acetato de bornilo	Bornyl acetate	1265	1.2	1.2	1.2	1.3	0.8	1.2	1.2	1.2
Acetato de α -terpenilo	α -Terpenyl acetate	1334	0.1	t	0.1	0.1	t	0.1	0.1	0.1
α -Cubebeno	α -Cubebene	1345	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2
α -Copaeno	α -Copaene	1375	t	t	t	t	t	t	t	t
β -Bourboneno	β -Bourbonene	1379	t	t	t	t	t	0.1	t	t
β -Elemeno	β -Elemene	1388	0.1	0.1	t	t	t	t	t	t
β -Cariofileno	β -Caryophyllene	1414	0.1	t	t	t	t	0.1	0.1	0.1
β -Copaeno	β -Copaene	1426	0.1	t	t	t	t	0.1	0.1	0.1
α -Humuleno	α -Humulene	1447	t	t	t	t	t	t	t	t
γ -Muurolo	γ -Muurolene	1469	t	t	t	t	t	t	t	t
Germacreno D	Germacrene D	1474	0.8	0.3	0.3	0.5	0.3	t	0.7	0.6
Biciclogermacreno	Bicyclogermacrene	1487	0.1	0.1	0.1	t	t	0.1	0.1	0.1
α -Muurolo	α -Muurolene	1494	0.1	0.1	0.1	0.1	t	0.2	0.1	0.3
γ -Cadineno	γ -Cadinene	1500	0.3	0.2	0.2	0.2	0.1	0.6	0.5	0.4
<i>trans</i> -Calameneno	<i>trans</i> -Calamenene	1505	t	t	t	t	t	t	t	t
δ -Cadineno	δ -Cadinene	1505	0.4	0.4	0.5	0.6	0.2	t	1.1	1.1
Elemol	Elemol	1530	1.4	1.4	2.5	3.6	1.2	1.1	1.4	1.6
Germacreno D-4-ol *	Germacrene D-4-ol *	1557	0.3	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2
Óxido de β -cariofileno	β -Caryophyllene oxide	1561	t	0.1	0.2	t	t	0.1	t	t
Anidrooplopanona	Anhydrooplopanone	1576	t	t	t	t	t	t	t	t
γ -Eudesmol	γ -Eudesmol	1609	0.1	0.1	0.2	0.5	0.2	0.1	0.2	0.2
T-Cadinol	T-Cadinol	1616	t	0.1	0.2	0.2	t	t	0.1	0.1
T-Muurolo	T-Muurolol	1616	t	t	t	t	t	t	t	t
β -Eudesmol	β -Eudesmol	1620	0.2	0.1	0.3	0.5	0.3	0.2	0.3	0.4
α -Eudesmol	α -Eudesmol	1634	0.3	0.3	0.7	1.1	0.4	0.3	0.4	0.5
Criptomeriona*	Cryptomerione*	1686	t	t	t	t	t	t	t	t

Componentes	Components	IR / RI	18056 A1	18056 A2	18056 A3	18056 A4	18056 A5	18056 A6	18056 A7	18056 A8
Rimueno	Rimuene	1814	t	t	t	t	t	t	t	t
Isopimara-9(11),15-dieno	Isopimara-9(11),15-diene	1821	0.5	0.3	0.4	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1
NI 1	UI 1	1915	0.6	0.3	0.5	0.6	0.2	0.1	0.3	0.2
NI 2	UI 2	1915	0.9	0.6	1.1	1.5	0.2	0.3	0.1	0.3
NI 3	UI 3	1924	0.7	0.5	0.7	0.8	0.1	0.1	0.2	0.2
Sandaracopimara-8(14),15-dieno	Sandaracopimara-8(14),15-diene	1956	0.6	0.4	0.5	0.6	0.1	0.1	0.1	0.1
Filocladeno	Phyllocladene	2006	7.7	4.7	7.2	9.4	1.7	1.5	1.6	1.7
Caureno	Kaurene	2044	1.3	0.8	1.5	2.2	0.5	0.5	0.5	0.6
Abietadieno	Abietadiene	2060	t	t	0.1	t	t	t	t	t
NI 4	UI 4	2176	1.2	0.7	1.1	1.5	0.3	0.2	0.3	0.3
% Identificação	% identification		96.5	97.2	95.9	94.1	98.9	97.5	98.3	98.3
Componentes agrupados	Grouped components									
Hidrocarbonetos monoterpénicos	Monoterpene hydrocarbons		78.2	83.5	76.3	69.5	91.2	88.0	86.3	85.9
Monoterpenos oxigenados	Oxygen-containing monoterpenes		3.8	4.0	4.4	4.4	2.4	4.0	4.1	4.0
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	Sesquiterpene hydrocarbons		2.1	1.3	1.3	1.5	0.7	1.3	2.9	2.9
Sesquiterpenos oxigenados	Oxygen-containing sesquiterpenes		2.3	2.2	4.2	6.1	2.2	2.0	2.7	3.0
Hidrocarbonetos diterpénicos	Diterpene hydrocarbons		10.1	6.2	9.7	12.6	2.4	2.2	2.3	2.5
Outros	Others		t	t	t	t	t	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.

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

Local de recolha: Achadinha, Nordeste, Açores, Portugal (Mata ca. 50 anos)

Tipo de mata: Cultivo

Ano / mês de recolha: 2018 / 05

Cota: 6 (+500m)

Tipo de solo: Andossolo

Parte da planta: parte aérea – ramadas e bicadas

Método de extração: Destilação por arrastamento de vapor

Amostra: 8 óleos essenciais (OEs); 2 lotes de OE com 4 amostras por lote (1 a 4 e 5 a 8)

Tabela 1. Código das amostras recebidas em maio de 2018 e condições de extração de 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)
18056A1	Amostra não estilhada	1:00	0,22
18056A2	Amostra não estilhada	1:30	0,22
18056A3	Amostra não estilhada	2:00	0,22
18056A4	Amostra não estilhada	2:30	0,22
18056A5	Amostra estilhada	0:25	0,31
18056A6	Amostra estilhada	0:55	0,31
18056A7	Amostra estilhada	1:25	0,31
18056A8	Amostra estilhada	1:55	0,31

As oito amostras de OEs de *C. japonica* representativas do mês de maio de 2018 fornecidos pela Azorina S.A. foram analisadas através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C RMN). Adicionalmente, à análise dos OEs por GC e GC-MS, a espectroscopia de ^{13}C RMN é uma técnica complementar que pode ser utilizada para análise de identificação de compostos existentes em misturas complexas como os OEs. Esta técnica de espectroscopia, não destrutiva, oferece vantagens na resolução de problemas de modo mais eficaz relativamente a outras técnicas físicas ou físico-químicas de análise. Saliente-se, a capacidade de elucidação estrutural e identificação de vários tipos de compostos químicos existentes em misturas complexas sem necessidade prévia de separação, sendo possível a atribuição dos sinais de desvios químicos característicos a cada tipo de família ou grupos funcionais de compostos. A análise qualitativa é feita através da comparação dos picos existentes no espectro do OE com os picos dos compostos puros (padrões) adquiridos nas mesmas condições de análise (solvente, temperatura, referência, etc).

Da Tabela 1 pode observar-se que em cada lote (amostras não estilhadas e estilhadas) o tempo de destilação não influencia o rendimento da extração do OE.

O perfil químico de ^{13}C RMN de todas as amostras de OEs é semelhante. A análise comparativa dos espectros dos 8 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 OE. Outros compostos voláteis como mirceno, limoneno e α -terpineno foram também detetados em menores percentagens, seguidos de compostos oxigenados como terpinen-4-ol e elemol, entre outros, mas em percentagens diminutas (Figura 1 e suas ampliações Figuras 1.1 e 1.2). Os OEs do lote com ramas e bicadas não estilhadas, amostras 1 a 4, apresentam uma maior quantidade de compostos mais pesados do tipo diterpénicos.

Numa tentativa de identificação de um maior número de terpenos que constituem estes OEs, foi selecionada a amostra 18056A4, do primeiro lote com 2:30 h de destilação. Esta amostra para além dos compostos já referidos anteriormente (α -pineno, sabineno, mirceno, limoneno, terpinen-4-ol e elemol) apresenta uma quantidade considerável de hidrocarbonetos mais pesados do tipo diterpenos. Assim, a análise de ^{13}C RMN da mostra 18056A4 (Figura 1 e ampliações 1.1 e 1.2) e por comparação dos espectros de amostras de OEs de *C. japonica* já estudados, foi detetada a existência de isómeros de diterpenos do tipo pimarano, caurano e abietano. Destaca-se a presença de filocladeno e *ent*-caureno, sandacopamaradieno e em percentagens vestigiais diterpenóides oxigenados.

A composição em diterpenos carece do isolamento dos seus compostos químicos e elucidação estrutural para posteriormente poderem ser utilizados como padrões, os quais não existem comercialmente.

Devido à semelhança estrutural destes diterpenos relacionada com a isomeria, há necessidade de averiguar se nas amostras de OEs dos próximos meses ocorre aumento na percentagem destes compostos de modo a facilitar o seu isolamento.

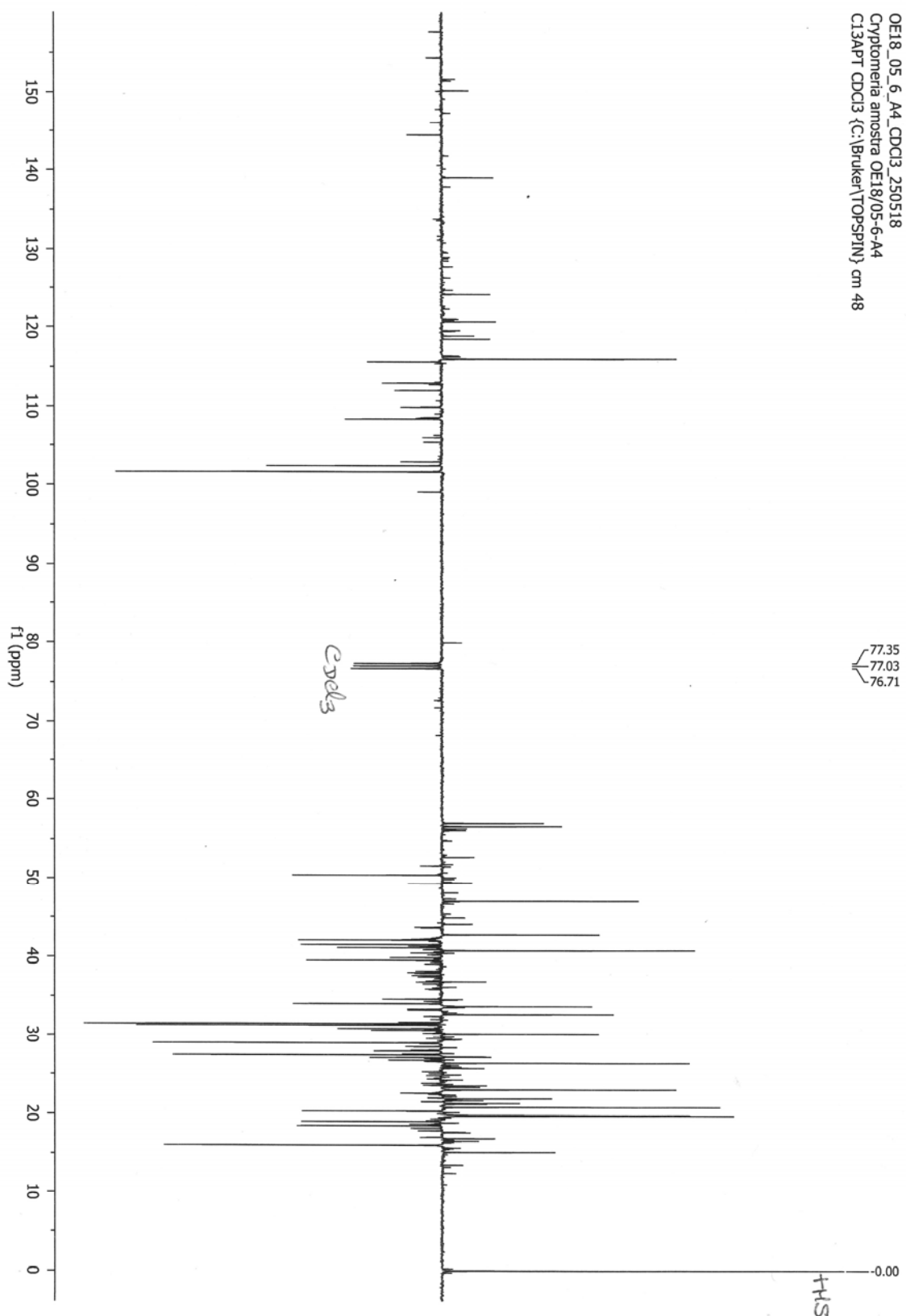


Figura 1. Espectro de ^{13}C RMN (APT) do OE da amostra 18056A4 em CDCl_3 (referência Tetrametilsilano - TMS). Aparelho de RMN de 400 MHz.

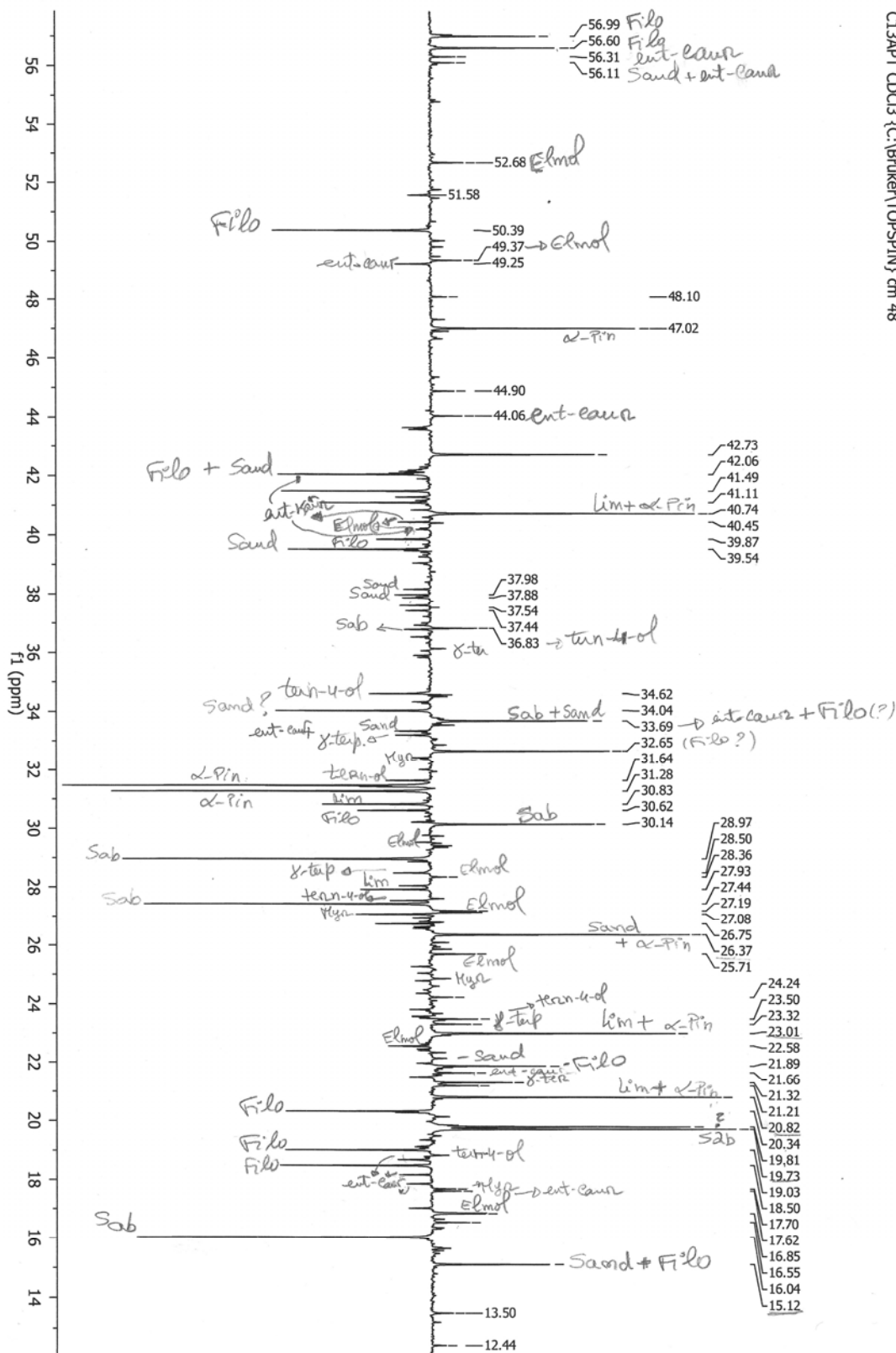


Figura1.1- Ampliação da Figura 1 (δ 12 – 58 ppm). Identificação dos compostos: **α-Pin-** α-Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno; **γ-Ter** – γ-Terpineno; **Tern-4-ol** – Terpinen-4-ol; **Emol-** Elemol; **Filo-** Filocladeno; **ent-Caur-** ent-Caureno; **Sand-** Sandacopamarineno.

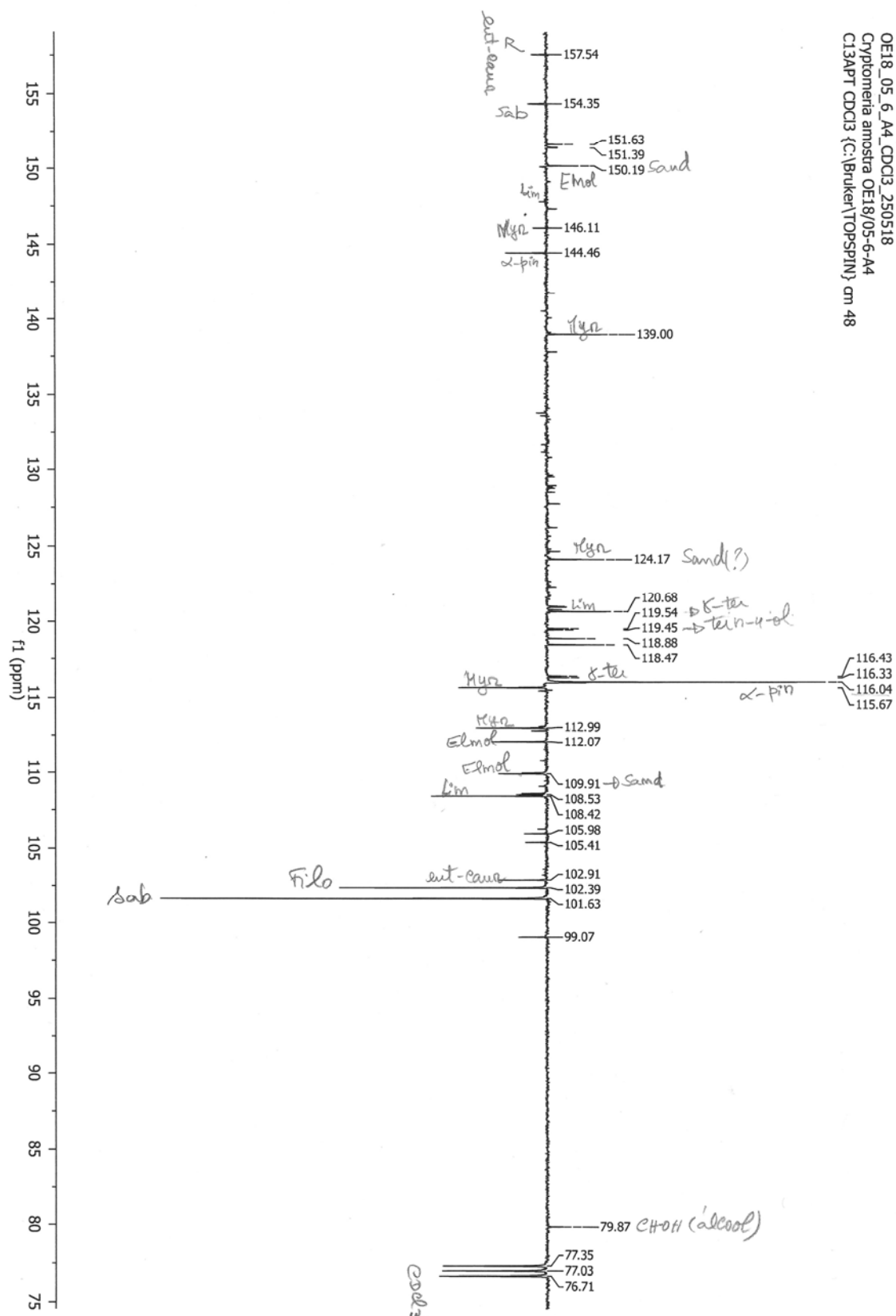


Figura 1.2- Ampliação da Figura 1 (δ 75 – 160 ppm). Identificação dos compostos: **α -Pin-** α -Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno; **γ -Ter** – γ -Terpineno; **Tern-4-ol**- Terpinen-4-ol; **Emol**- Elemol; **Filo**- Filocladeno; **ent-Caur**- ent-Caureno; **Sand**- Sandacopamarineno.

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

Analysis by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^{13}C NMR)

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

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

Producer: Azorina S. A.

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

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

Scientific name: *Cryptomeria japonica* D. Don

Common name: Japanese cedar; Sugi

Place of collection: Achadinha, Nordeste, Azores, Portugal (Woods ca. 50 years)

Type of forest: Cultivar

Production Year / production month: 2018 / 05

Quota: 6 (+500m)

Types of soils: Andosols

Part of plant: Aerial parts – tree branches

Extraction procedure: Steam-distillation

Sample: 8 Essential Oils (EOs); 2 lots of EOs [4 samples by lot (1 to 4 and 5 to 8)]

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

Code (Year;month;quota;soil type;sample number)	Plant processing	Distillation time (h:min)	Yield (%, v/w)
18056A1	Uncut branches	1:00	0.22
18056A2	Uncut branches	1:30	0.22
18056A3	Uncut branches	2:00	0.22
18056A4	Uncut branches	2:30	0.22
18056A5	Cut branches	0:25	0.31
18056A6	Cut branches	0:55	0.31
18056A7	Cut branches	1:25	0.31
18056A8	Cut branches	1:55	0.31

The eight samples of *C. japonica* EOs, representative of May 2018, produced by Azorina S.A. were analysed through ^{13}C RMN. In addition to capillary gas chromatography (GC) and GC-MS, ^{13}C NMR spectroscopy provides a complementary identification tool for EOs analysis.

For the analysis of the essential oils ^{13}C NMR spectroscopy offers particular advantages for solving certain interesting problems more easily and successfully than is possible with other physical or physicochemical techniques and is a non-destructive technique. Most important is the ability to analyse complex mixtures such as EO samples without preliminary separation of their components, made feasible by good separation of the individual NMR signals. Furthermore, direct information about molecular structure and functional groups of individual components is obtained from chemical shift values. The qualitative analysis of EOs is based upon the comparison of the oil spectrum with the spectra of the pure oil components, which should be recorded, if possible, under identical conditions (solvent, temperature, reference, etc.).

The extraction yield of the EOs do not depend of the distillation times, as shown in Table 1.

The ^{13}C RMN chemical profile of all EO samples is similar. The comparative analysis of eight OEs with the spectra of the pure oil components, is characterized by high contents of monoterpene hydrocarbons, such as α -pinene and sabinene, which correspond to ca. 50% of the total oil percentage. Other volatile compounds as myrcene, limonene and α -terpinene with low content were also detected (Figure 1 and its expansion

Figures 1.1 and 1.2). The oxygenated compounds, such as elemol, terpinen-4-ol, and others were also identified but in low contents.

The oils (1 to 4) from uncut branches samples have more quantity of the diterpenoid compounds than oils extracted from cut branches samples.

In order to identify a collection of diterpenic compounds constituent of oils we selected a sample 18056A4, which oil was obtained from uncut branches samples and distillation during 2:30 h. This EO contains high content of compounds, as yet cited, (α -pinene, sabinene, myrcene, limonene, terpinen-4-ol and elemol) and have also considerable amount of several diterpenoids. In this context, ^{13}C RMN analysis of the 18056A4 sample (Figures 1.1 and 1.2) and by comparison of *C. japonica* oils, yet studied, the existence of diterpene isomers of pimarane, kaurane and abietane were detected. Among those, the phyllocladene, *ent*-kaurene and sandacopamaradiene were identified. Scarce contents of oxygenated diterpenoids was also observed in this sample.

It is convenient in the future proceed to the isolation and structural elucidation of diterpenoids from enriched samples in these compounds which could be used as standard compounds. Some of them are not commercially available.

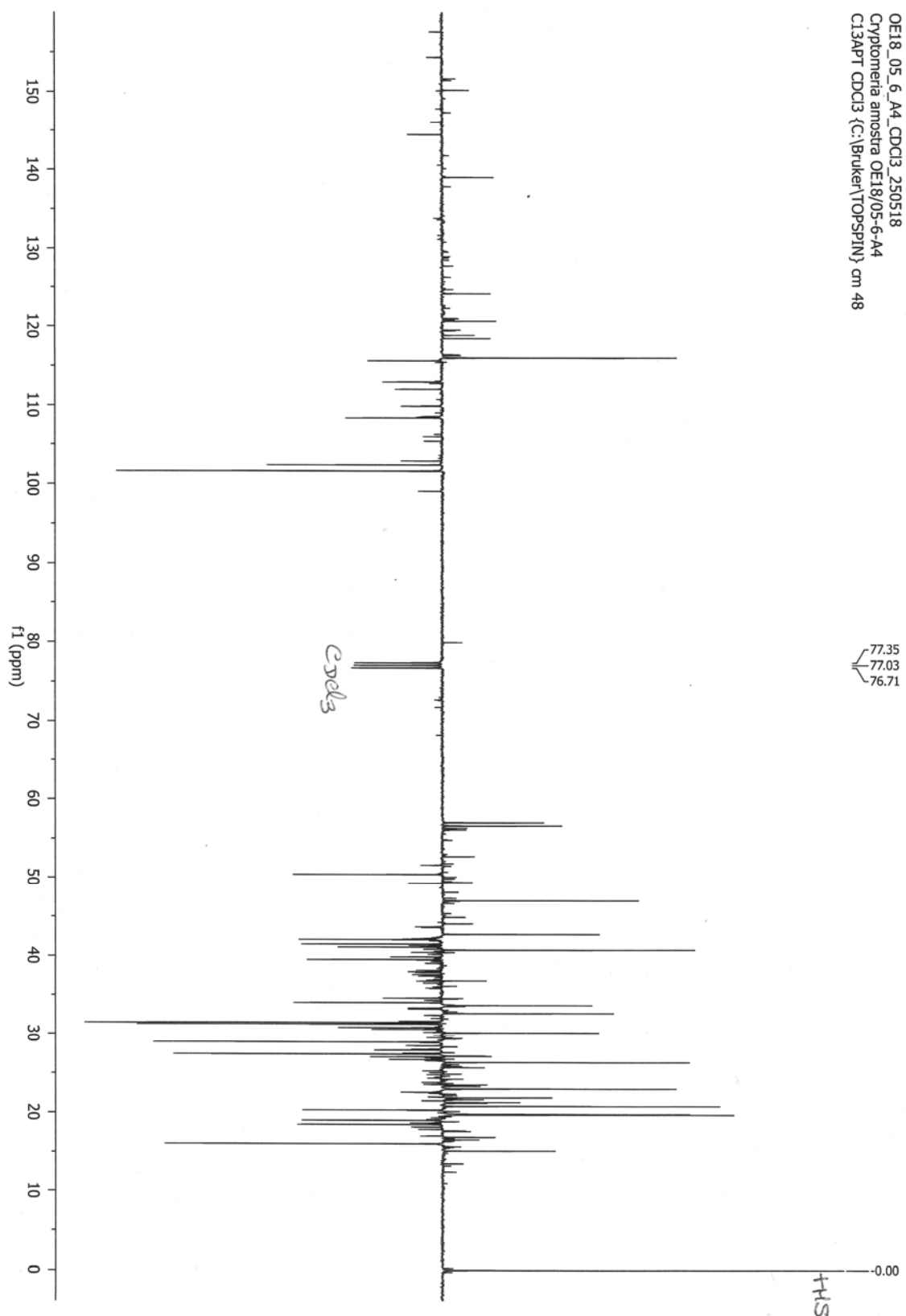
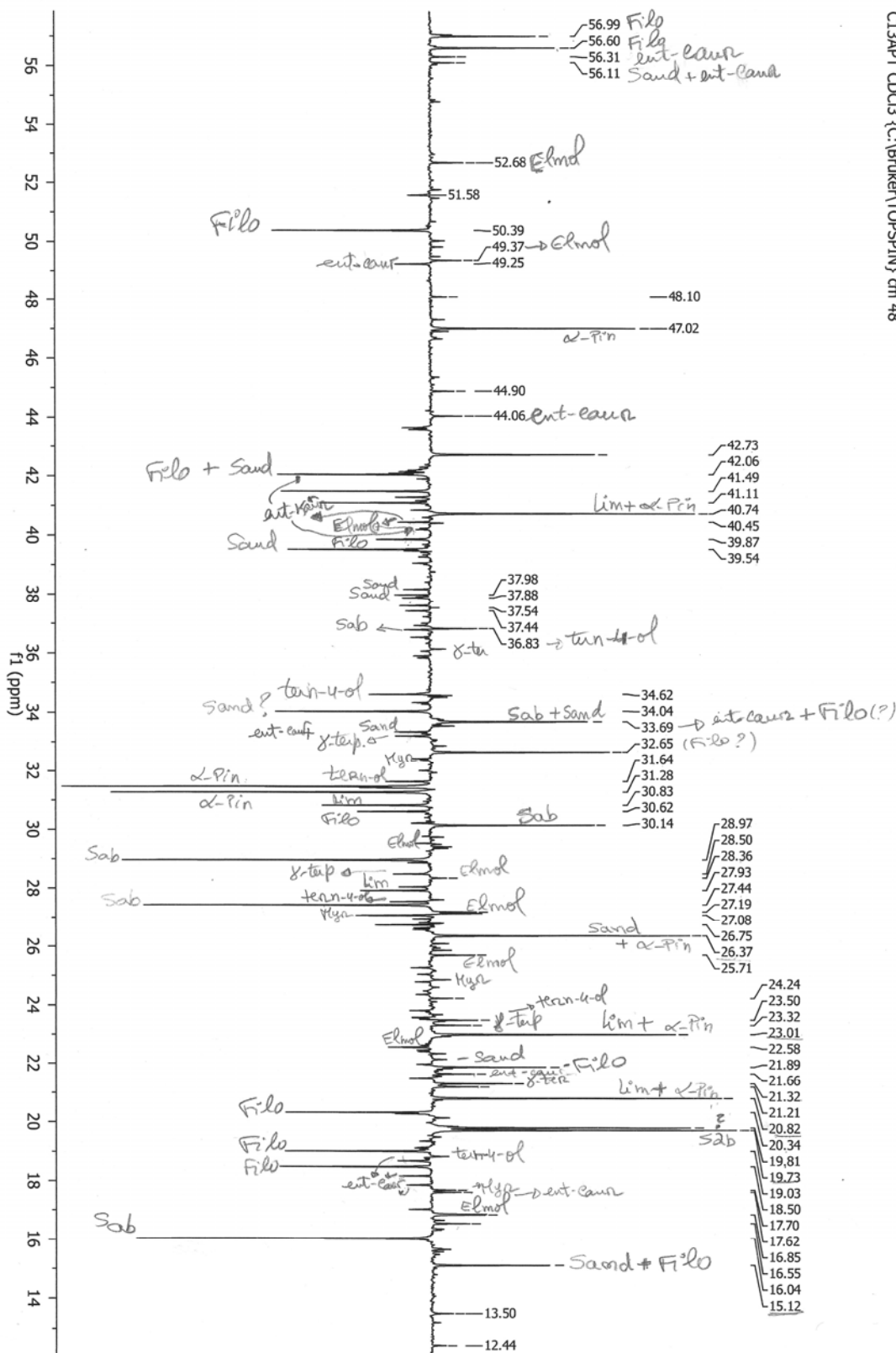


Figure 1. ^{13}C NMR (APT) of sample 18056A4 in CDCl_3 (reference Tetramethylsilane – TMS). Acquisition in 400 MHz NMR.



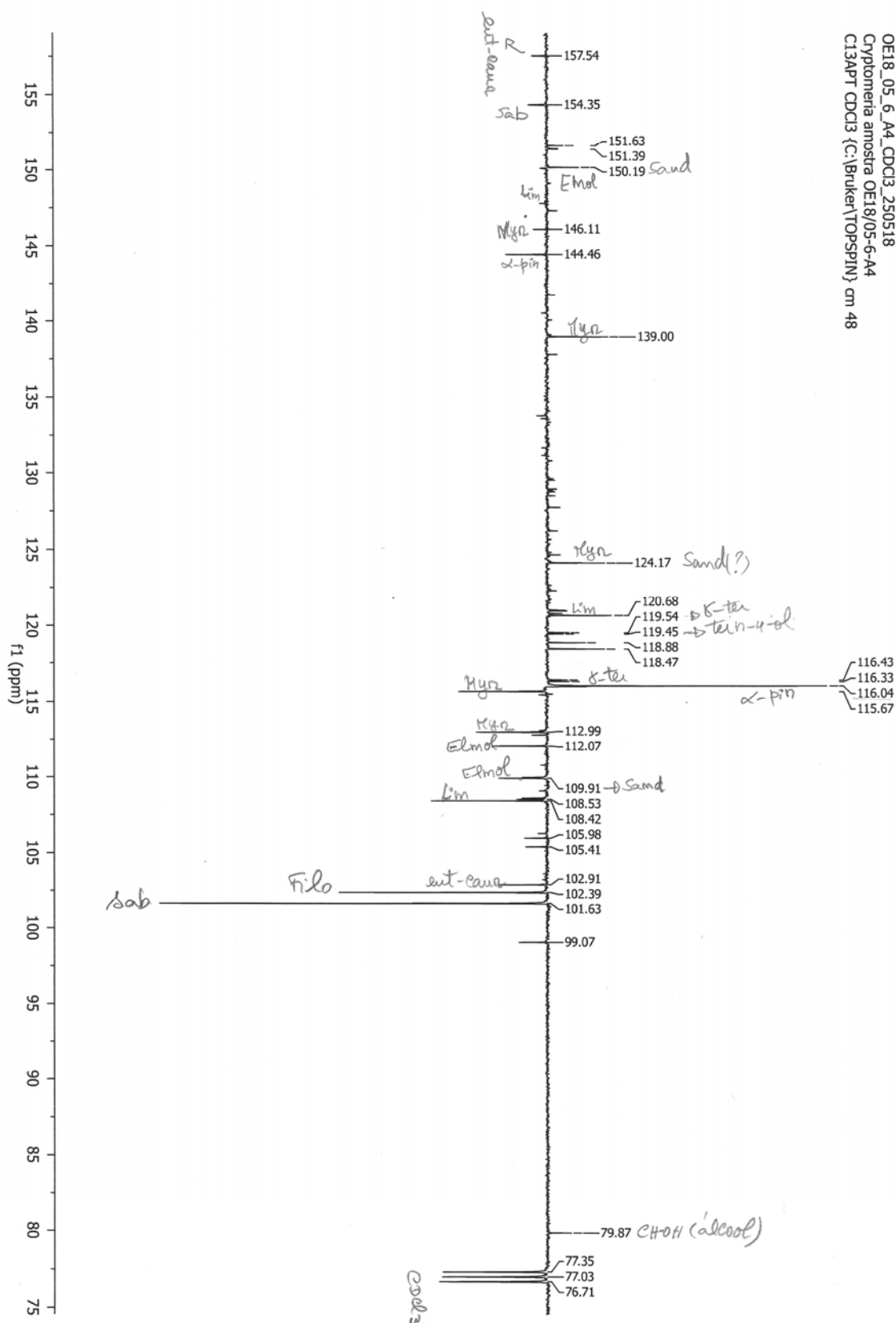


Figure 1.2- Expansion of the Figure 1 (δ 75 - 160 ppm). Name of compounds: **α -Pin**- α -Pinene; **Sab** – Sabinene; **Lim** – Limonene; **Myr** – Myrcene; **γ -Ter** – γ -Terpinene; **Tern-4-ol**- Terpinen-4-ol; **Emol**- Elemol; **Filo**-Phyllocladene; **ent-Kaur**- ent-Kaureno; **Sand**- Sandacopamarine.

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