

Relatório no âmbito do projeto

Report on project

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

Dezembro, 2018

December, 2018



Centro de Biotecnologia Vegetal (CBV), CESAM Lisboa
Centro de Química e Bioquímica (CQB)



GOVERNO
DOS AÇORES



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu de
Desenvolvimento Regional

Índice / Table of contents

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

CBV, CESAM Lisboa

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	vide página seguinte / vide overleaf
Floral ou Vegetativo / Floral or Vegetative	
Mês, ano de colheita / Harvest month, year	vide página seguinte / vide overleaf
Exemplar de herbário / Voucher code	
Código de colheita / Harvest code	

Identificação do local de cultura ou colheita / Identification of the place of cultivation or harvesting

Local, país / Place, country	vide página seguinte / vide overleaf
Cultivo, Espontânea / Cultivation, Wild harvest	Matas / Woods
Modo de cultivo / Cultivation method	

Identificação da amostra / Sample identification

Amostra / Sample:	Óleo essencial / Essential oil
Método de extração / Extraction procedure	vide página seguinte / vide overleaf
Tempo de extração / Extraction time	vide página seguinte / vide overleaf
Rendimento (% v/p.f. ou v/p.s.) / Yield (% v/f.w. or v/d.w.)	vide página seguinte / vide overleaf
Mês, ano de engarrafamento / Bottling month, year	
Validade / Shelf life	
Código da amostra / Sample code	vide página seguinte / vide 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 Novembro de 2018.

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

<i>Cryptomeria japonica</i> (L. fil.) D. Don					Óleo Essencial / Essential Oil				
Tipo de material		Sample type	Origem	MAC	ME	TD	R	Código	
			Provenance	MYC	EP	DT	Yield	Code	
						(h:min)	(%, v/p)		
Ramadas e bicadas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Woodchips	Três Cantos, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores	Nov-18	H	1:33	0.17	1_18114L1
Ramadas e bicadas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Woodchips	Viveiro Florestal da Falca, S. Bartolomeu, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores	Nov-18	H	2:00	0.09	2_18114A2
Ramadas e bicadas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Woodchips	Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores	Nov-18	H	1:40	0.39	3_18114L3
Ramadas e bicadas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Woodchips	Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores	Nov-18	H	1:43	0.40	4_18114L4
Ramas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Woodchips	Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores	Nov-18	H	1:43	0.29	5_18114L5
Ramas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Woodchips	Encosta do Pico, Agualva, Praia da Vitória, Terceira, Açores	Nov-18	H	1:43	0.40	6_18115A6
Ramadas e bicadas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Woodchips	Espigão, Água de Pau, Lagoa, São Miguel, Açores	Nov-18	SD	2:05	0.32	18114A
Ramadas e bicadas	Estilhado à mão	Branches from landscaping	Woodchips	Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores	Nov-18	SD	2:05	0.22	18116A

MAC: Mês, ano de colheita. MYC: Month, year of collection. ME: Método de Extração. EP: Extraction Procedure. TD: Tempo de destilação. DT: Distillation time. R: Rendimento. H: Hydrodistillation. SD: Steam distillation.

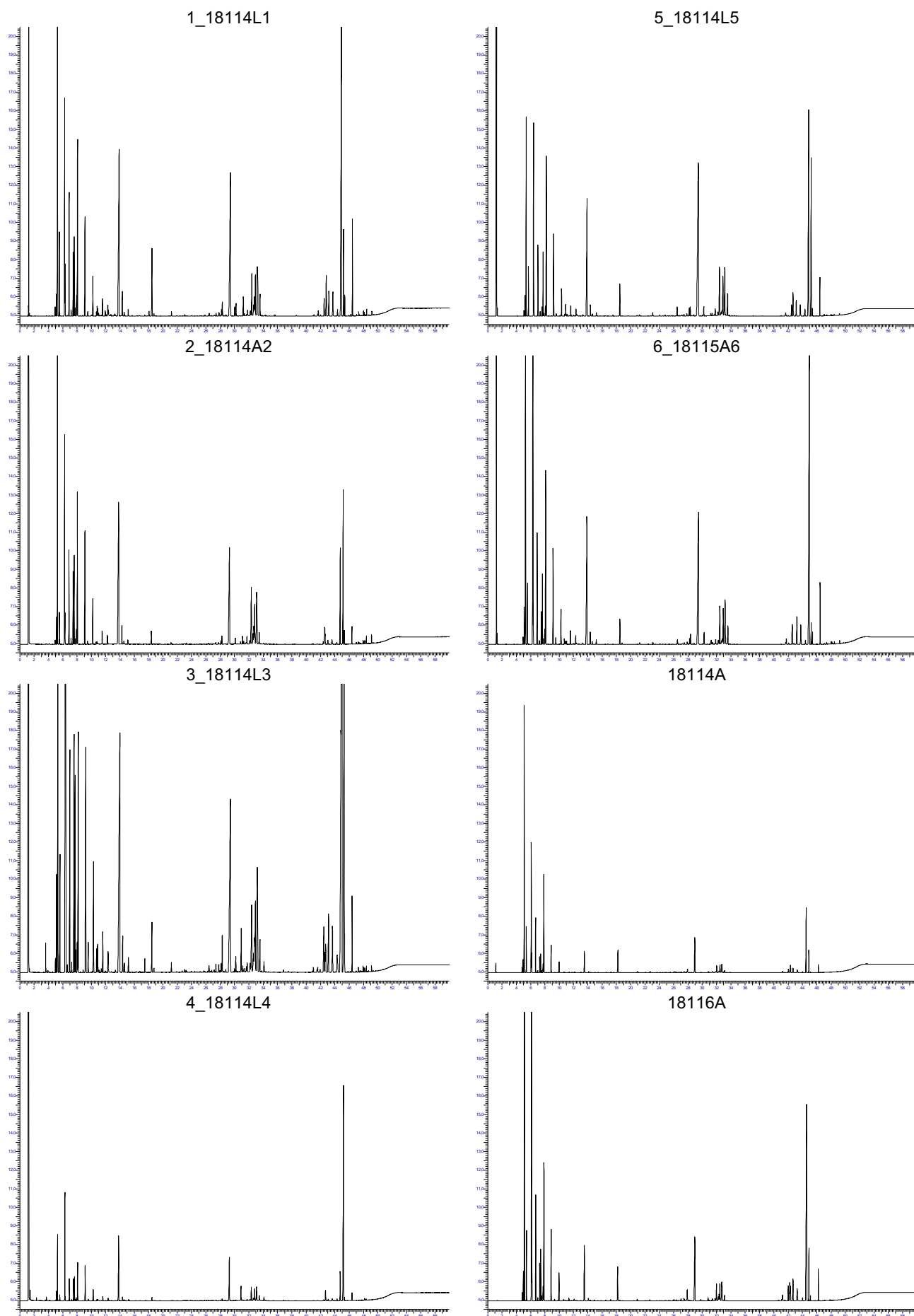


Fig. 1. Perfis cromatográficos das amostras analisadas. / **Fig. 1.** Gas chromatography profiles, taken on the DB-1 column, of the essential oils isolated from *Cryptomeria japonica* samples (for sample codes, see Table 1).

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

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

Componentes	Components	IR / RI	1_1811	2_1811	3_1811	4_1811	5_1811	6_1811	111811	114A1811	16A
			4L1	4A2	4L3	4L4	4L5	5A6			
Triciclano	Tricyclene	921	0.2	0.1	0.1	t	0.2	0.2	0.4	0.3	
α-Tujeno	α-Thujene	924	0.4	0.8	1.0	1.3	0.6	0.9	1.0	1.0	
α-Pineno	α-Pinene	930	12.0	13.7	7.5	5.9	5.8	13.0	22.8	17.2	
Canfeno	Camphene	938	1.3	1.1	1.0	0.7	1.4	1.2	3.6	2.1	
Sabineno	Sabinene	958	5.2	7.9	12.1	10.3	6.6	13.8	12.0	13.6	
β-Pineno	β-Pinene	963	0.5	0.8	1.2	1.0	0.7	1.4	1.2	1.4	
β-Mirceno	β-Myrcene	975	2.4	3.3	2.5	2.1	2.2	2.8	4.8	3.7	
α-Felandreno	α-Phellandrene	995	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	
δ-3-Careno	δ-3-Carene	1000	1.3	2.6	2.7	2.2	0.3	0.8	1.4	1.3	
α-Terpineno	α-Terpinene	1002	1.6	3.3	2.2	2.4	1.9	1.8	1.6	1.8	
p-Cimeno	p-Cymene	1003	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.5	0.2	
β-Felandreno	β-Phellandrene	1005	0.5	0.6	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.6	
Limoneno	Limonene	1009	4.3	6.4	3.3	3.9	6.0	5.3	9.6	6.3	
cis-β-Ocimeno	cis-β-Ocimene	1017	t	t	t	t	t	t	t	t	
trans-β-Ocimeno	trans-β-Ocimene	1027	t	t	t	t	t	t	t	t	
γ-Terpineno	γ-Terpinene	1035	2.5	5.2	3.4	3.8	2.9	2.8	2.6	3.0	
Hidrato de trans-sabineno	trans-Sabinene hydrate	1037	t	0.1	0.1	t	t	t	t	t	
2,5-Dimetil estireno	2,5-Dimethyl styrene	1059	t	t	t	t	t	t	t	t	
Terpinoleno	Terpinolene	1064	0.9	1.8	1.3	1.3	1.0	1.0	1.1	1.2	
Hidrato de cis-sabineno	cis-Sabinene hydrate	1066	t	t	t	t	t	t	t	0.1	
Linalol	Linalool	1074	0.2	0.1	0.2	0.1	0.4	0.2	0.1	0.1	
trans-Tujona	trans-Thujone	1081	0.2	t	0.4	t	t	t	t	t	
Acetato de 1-octen-3-ilo	1-Octen-3-yl acetate	1086	0.2	t	t	0.3	t	t	t	t	
trans-p-2-Menten-1-ol	trans-p-2-Menthen-1-ol	1099	t	0.5	0.1	0.5	t	t	0.1	0.1	
Cânfora	Camphor	1102	0.1	0.4	0.2	t	t	t	t	t	
cis-p-2-Menten-1-ol	cis-p-2-Menthen-1-ol	1114	0.4	t	0.3	0.4	0.3	0.3	t	t	
Borneol	Borneol	1134	0.1	t	t	t	t	t	t	t	
Terpinen-4-ol	Terpinen-4-ol	1148	9.9	13.2	7.8	8.1	8.6	8.0	2.5	3.0	
Salicilato de metilo	Methyl salicylate	1159	t	t	t	t	t	t	t	t	
α-Terpineol	α-Terpineol	1159	0.7	0.8	0.4	0.5	0.4	0.4	0.1	0.1	
cis-Piperitol	cis-Piperitol	1182	t	t	t	t	t	t	t	t	
Acetato de α-fenchilo	α-Fenchyl acetate	1200	0.1	0.2	t	0.1	t	t	t	t	
Piperitona	Piperitone	1211	0.1	t	t	t	t	t	t	t	
Geraniol	Geraniol	1236	0.1	t	t	t	t	t	t	t	
Acetato de linalilo	Linalyl acetate	1245	t	t	0.2	t	t	t	0.1	t	
trans-Anetole	trans-Anethole	1254	0.1	t	t	t	t	t	t	t	
Acetato de bornilo	Bornyl acetate	1265	2.2	0.6	0.6	0.4	1.4	1.0	3.2	1.7	
Acetato de cis-verbenilo	cis-Verbenyl acetate	1266	t	t	t	t	t	t	t	t	
Acetato de α-terpenilo	α-Terpenyl acetate	1334	0.1	t	0.1	t	t	t	0.1	0.1	
α-Cubebeno	α-Cubebene	1345	t	t	t	t	0.1	0.1	t	t	
Acetato de geraniol	Geranyl acetate	1370	t	t	t	t	t	t	t	t	
α-Copaeno	α-Copaene	1375	t	t	t	t	t	t	t	t	
Metil eugenol	Methyl eugenol	1377	t	t	t	t	t	t	t	t	
β-Bourboneno	β-Bourbonene	1379	t	t	t	t	t	t	0.1	t	
β-Elemeno	β-Elemene	1388	0.1	t	t	t	t	t	t	t	
β-Cariofileno	β-Caryophyllene	1414	t	t	t	t	t	t	0.1	t	
β-Copaeno	β-Copaene	1426	t	t	t	t	t	t	t	t	
α-Humuleno	α-Humulene	1447	t	t	t	t	t	t	t	t	
γ-Muurolo	γ-Muurolene	1469	t	0.1	0.1	t	0.5	t	t	t	
Germacreno D	Germacrene D	1474	0.1	t	t	t	t	0.2	0.2	0.1	
Biciclogermacreno	Bicyclogermacrene	1487	t	t	t	t	t	t	0.1	0.2	
α-Muurolo	α-Muurolene	1494	0.1	0.1	0.1	t	0.1	t	t	0.7	
γ-Cadineno	γ-Cadinene	1500	0.2	0.1	0.1	t	0.4	0.2	0.3	t	
β-Bisaboleno	β-Bisabolene	1500	0.3	0.2	0.5	0.1	t	0.2	t	t	
trans-Calameneno	trans-Calamenene	1505	t	t	t	t	t	t	t	t	
δ-Cadineno	δ-Cadinene	1505	0.5	0.4	t	0.3	0.4	0.4	0.3	t	
Elemol	Elemol	1530	11.1	7.6	6.1	6.5	18.7	11.0	6.7	5.1	
trans-Nerolidol	trans-Nerolidol	1549	0.3	t	t	t	t	t	t	t	
Germacreno D-4-ol *	Germacrene D-4-ol *	1557	0.4	0.3	0.2	t	0.5	0.4	t	t	
Óxido de β-cariofileno	β-Caryophyllene oxide	1561	t	t	t	t	t	t	t	t	
Cedrol	Cedrol	1574	t	t	0.7	0.9	0.1	t	t	t	
Anidrooplopanona	Anhydrooplopanone (= β-Oplopanone)	1576	0.7	0.4	0.1	1.0	0.1	0.2	t	0.2	
10-epi-γ-Eudesmol	10-epi-γ-Eudesmol	1593	0.3	0.4	0.1	t	0.4	0.2	0.3	0.1	
γ-Eudesmol	γ-Eudesmol	1609	1.9	3.3	1.3	1.7	2.8	1.7	1.1	1.1	
T-Cadinol	T-Cadinol	1616	0.6	0.7	0.5	0.3	0.4	0.3	0.2	0.4	
T-Muurolo	T-Muurolo	1616	0.7	0.9	t	0.4	0.3	0.1	0.1	t	

Componentes	Components	IR / RI	1_1811	2_1811	3_1811	4_1811	5_1811	6_1811	1811A	18116A
			4L1	4A2	4L3	4L4	4L5	5A6		
α -Muuroiol (= δ -Cadinol)	α -Muuroiol (= δ -Cadinol)	1618	0.4	1.0	t	0.7	1.0	0.8	0.3	0.2
β -Eudesmol	β -Eudesmol	1620	1.8	1.2	0.6	1.0	1.4	0.8	1.0	1.0
α -Cadinol	α -Cadinol	1626	2.0	3.1	1.4	1.0	1.0	1.0	0.8	1.0
α -Eudesmol	α -Eudesmol	1634	1.9	1.6	2.7	1.6	2.4	1.4	1.0	1.0
Criptomeriona *	Cryptomerione *	1686	t	t	t	t	t	t	t	t
Acetato de oplopanoilo *	Oplopanoyl acetate *	1808	t	t	t	t	t	t	t	t
Rimueno	Rimuene	1814	t	t	0.1	t	0.1	0.1	0.2	t
Isopimara-9(11),15-dieno	Isopimara-9(11),15-diene	1821	0.3	t	t	t	0.1	0.2	0.2	0.4
NI 1	UI 1	1915	0.7	0.2	0.8	1.4	1.5	0.6	0.6	1.1
NI A'	UI A'	1915	0.9	0.8	0.3	0.1	t	0.1	0.6	1.4
NI 2	UI 2	1915	1.0	0.5	0.4	0.3	t	t	1.0	1.0
NI 3	UI 3	1924	1.1	0.2	1.0	0.2	0.7	1.1	0.5	1.5
Sandaracopimara-8(14),15-dieno	Sandaracopimara-8(14),15-diene	1956	1.1	0.3	0.8	0.1	0.7	0.8	0.7	1.3
Filocladeno*	Phyllocladene	2006	17.4	3.7	19.8	2.6	12.6	18.0	9.5	18.3
Caureno	Kaurene	2044	2.3	6.7	9.7	31.1	7.2	0.5	2.5	2.4
Abietadieno	Abietadiene	2060	t	t	t	t	t	t	t	t
NI 4	UI 4	2176	2.1	0.4	0.7	0.5	1.2	1.3	0.5	1.1
Phyllocladanol *	Phyllocladanol *	2200	t	t	t	t	t	t	t	t
% Identificação	% identification		93.5	96.5	94.6	95.4	92.7	94.2	96.1	93.5
Componentes agrupados	Grouped components									
Hidrocarbonetos monoterpénicos	Monoterpene hydrocarbons		33.5	48.0	38.9	35.4	30.3	45.7	63.2	53.8
Monoterpenos oxigenados	Oxygen-containing monoterpene hydrocarbons		14.2	15.9	10.4	10.1	11.1	9.9	6.2	5.2
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	Sesquiterpene hydrocarbons		1.3	0.9	0.8	0.4	1.5	1.1	1.1	1.0
Sesquiterpenos oxigenados	Oxygen-containing sesquiterpene hydrocarbons		22.1	20.5	13.7	15.1	29.1	17.9	11.5	10.1
Hidrocarbonetos diterpénicos	Diterpene hydrocarbons		22.1	11.2	30.8	34.1	20.7	19.6	14.1	23.4
Diterpenos oxigenados	Oxygen-containing diterpene hydrocarbons		t	t	t	t	t	t	t	t
Fenilpropanóides	Phenylpropanoids		0.1	t	t	t	t	t	t	t
Outros	Others		0.2	t	t	0.3	t	t	t	t

IR – Índices de retenção calculados relativamente a uma série de *n*-alcanos C₉-C₂₄ numa coluna DB-1, * Identificação baseada apenas no espetro de massa, NI – Compostos não identificados, t – em Português, v: vestigial (<0.05%).

RI - Retention index calculated relative to C₉-C₂₂ *n*-alkanes on the DB-1 column, * identification based on mass spectra only, UI – unidentified compounds, t - trace (<0.05%).

Agradecimentos: ao CESAM no âmbito do UID/AMB/50017 - POCI-01-0145-FEDER-007638, financiado pela FCT/MCTES e cofinanciado pelo FEDER e Compete 2020, e ao projeto SAI-AZOR/2018/392.

Acknowledgments: Thanks are due to CESAM UID/AMB/50017 - POCI-01-0145-FEDER-007638, supported by FCT/MCTES and the co-funding by FEDER and Compete 2020, and to project SAI-AZOR/2018/392.



GOVERNO
DOS AÇORES



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu de
Desenvolvimento Regional



Centro de Biotecnologia Vegetal, CESAM Lisboa, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

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-japones

Locais de recolha: Espigão, Água de pau, Lagoa, São Miguel, Açores (**4A**); Achadinha, Nordeste, São Miguel, Açores (Mata ca. 50 anos) (**6A**); Três Cantos, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores (**4L1**); Viveiro Florestal da Falca/são Bartolomeu, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores (**4A2**); Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores (**4L3**); Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores (**4L4**); Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Açores (**4L5**); Encosta do Pico Alto/Aqualva, Praia da Vitória, Terceira, Açores (**5A6**), Portugal.

Tipo de mata: Cultivo e Espontânea (Regeneração Natural)

Ano / mês de recolha: 2018 / 11

Cota: 4, 5 e 6

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

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

Método de extração: Destilação por arrastamento de vapor e hidrodestilação em aparelho de Clevenger (HC)

Amostra: 8 Óleos essenciais (OE); **4A** e **6A** (Ilha São Miguel); **4L1**, **4A2**, **4L3**; **4L4**; **4L5** e **5A6** (Ilha Terceira)

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

Código (ano; mês; cota; tipo de solo; nº da amostra)	Processamento da planta (Estado da planta)	Tipo de Mata	Método de Extração	Tempo de destilação (h:min)	Rendimento (%, v/p)
18114A	Amostra não estilhada; RB+E (Floral)	Cultivo	Arraste de vapor	2:05	0,32
18116A	Amostra não estilhada; RB+E (Floral)	Cultivo	Arraste de vapor	2:05	0,22
18114L1	Amostra cortada à mão; RB+E (Floral)	Cultivo	HC, 3 dias após coleta	1:33	0,17
18114L3	Amostra (juvenil) cortada à mão#	Espontânea ^a	HC, 4 dias após coleta	1:40	0,39
18114L4	Amostra (juvenil) cortada à mão#	Espontânea ^a	HC, 6 dias após coleta	1:43	0,40
18114L5	Amostra cortada à mão; R inferiores*	Cultivo ^a	HC, após coleta	1:43	0,29
18114A2	Amostra (juvenil) cortada à mão	Cultivo	HC, 3 dias após coleta	2:00	0,09
18115A6	Amostra cortada à mão; R inferiores*	Espontânea	HC, 2 dias após coleta	1:43	0,40

#Plantas de regeneração natural; *R inferiores- Ramadas coletadas da parte inferior da planta em pé; ^aCryptomeria da região de Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira; HC- Hidrodestilação em aparelho de Clevenger.

Em simultâneo com as análises de GC e GC-MS dos OEs procedeu-se à análise por ^{13}C RMN das 8 amostras de OEs de *C. japonica*, representativas do mês de novembro de 2018 fornecidos pela Azorina S.A.. Assim, seguindo o mesmo procedimento das amostras analisadas dos meses anteriores procedeu-se à análise comparativa da constituição química dos oito OEs, duas da Ilha de São Miguel, **4A** e **6A** e seis OEs da Ilha de Angra do Heroísmo, Terceira, **4L1**, **4L3**, **4L4**, **4L5**, **4A2** e **5A6**, referentes ao mês de novembro de 2018.

O perfil químico de ^{13}C RMN do OE **18114A** resultante de amostras de ramadas e bicadas não estilhadas misturadas **com estróbilos masculinos**, da mesma cota e do mesmo local da ilha de **São Miguel**, comparativamente ao OE 18104A é semelhante. Deteta-se que, no OE do mês de novembro, 18114A, diminuiu ligeiramente a quantidade de filocladeno e aumentou também ligeiramente o *ent*-caureno e α -pineno, com considerável aumento de limoneno. À semelhança do mês anterior também se observam alguns compostos mais oxidados, mas em percentagens reduzidas (Anexo, Figura 1).

O perfil químico de ^{13}C RMN do OE **18116A** de ramas e bicadas não estilhadas misturadas com **estróbilos masculinos**, da mesma cota e do mesmo local da Ilha de São Miguel, referente ao mês de novembro é semelhante ao OE do mês anterior (18106A), não se observando praticamente nenhuma variação na percentagem dos constituintes do óleo (Anexo, Figura 2).

Procedeu-se pela primeira vez à análise de seis OEs da Ilha Terceira, obtidos em aparelho de *Clevenger*, de amostras de ramadas e bicadas de criptoméria em litossolos, a quotas de 400m, de cultivo e por regeneração natural (4L1, 4L3, 4L4 e 4L5) e plantas em andossolos, de cultivo e regeneração natural a quotas de 400m e 500m, respetivamente (4A2 e 5A6).

O **OE18114L1** resultante de ramas e bicadas com estróbilos masculinos de criptoméria de cultivo na 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, contrariamente aos OEs da Ilha de São Miguel. Neste OE deteta-se ainda elemol, isómeros de eudesmol, acetato de bornilo, mirceno, α - e β -terpineno, sandacopamaradieno, entre outros álcoois como cadinol, e vestígios de sabineno e *ent*-caureno (Figura 3).

Os **OE18114L3** e **OE18114L4**, resultantes de ramas e bicadas de plantas juvenis (2 a 3 anos) de criptoméria espontânea (regeneradas de sementes originária do próprio povoamento adulto) existentes em Veredas, Terra Chã, apresentam uma variação significativa na percentagem dos seus constituintes. Estes dois OEs variam no tempo entre a coleta e a hidrodestilação (Tabela 1). O **OE18114L3**, extraído 4 dias após a coleta, é constituído por filocladeno, *ent*-caureno, com o primeiro diterpeno em maior percentagem relativamente ao segundo, elemol, eudesmol, terpinen-4-ol, limoneno, sandaracopamaradieno, mirceno, α - e β -terpineno, α -pineno e sabineno, sendo a percentagem destes dois últimos monoterpenos reduzida (Figura 4). O **OE18114L4** extraído 6 dias após a coleta, é constituído maioritariamente por *ent*-caureno seguido de terpinen-4-ol, limoneno, elemol, sabineno e vestígios de filocladeno (Figura 5). O perfil do **OE18114L5** extraído após a coleta de ramas e bicadas de criptoméria cultivada em Veredas, Terra Chã, é semelhante ao do **OE18114L3**, sendo o **OE18114L5** rico em elemol, filocladeno, *ent*-caureno, limoneno e terpinen-4-ol, com baixa percentagem de α -pineno e sabineno (Figura 6).

No que respeita aos OEs da Ilha Terceira de andossolos, foram analisados óleos oriundos de ramadas e bicadas de plantas juvenis de viveiro florestal da Falca a quota 400 m, **OE18114A2** e de ramadas de mata espontânea de ca. de 30 anos da Praia da Vitória a quota de 500 m, **OE18115A6**.

O **OE18114A2** tem baixas percentagens de diterpenos, *ent*-caureno e filocladeno, sendo este último praticamente metade do primeiro. A percentagem de monoterpenos 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 óleo é ainda constituído por uma quantidade razoável de terpinen-4-ol, elemol e limoneno, para além dos isómeros dos eudesmóis, sandaracopamaradieno, mirceno, α -cadinol, α - e β -terpineno, acetato de bornilo (Figura 7).

Contrariamente ao **OE18114A2** o **OE18115A6**, apresenta uma grande quantidade de filocladeno não existindo *ent*-caureno. Deteta-se também em percentagens muito semelhantes, sabineno e α -pineno e

terpinen-4-ol, elemol e limoneno, em quantidades também muito semelhantes, sendo os restantes constituintes vestigiais (Figura 8).

Como conclusão pode referir-se que os OEs de novembro de 2018 isolados por *Clevenger*, resultantes de diversas regiões da Terceira diferenciam-se dos OEs de São Miguel de matas de criptoméria com *ca.* de 30 a 40 anos e isolados por um processo industrial de arraste de vapor.

13

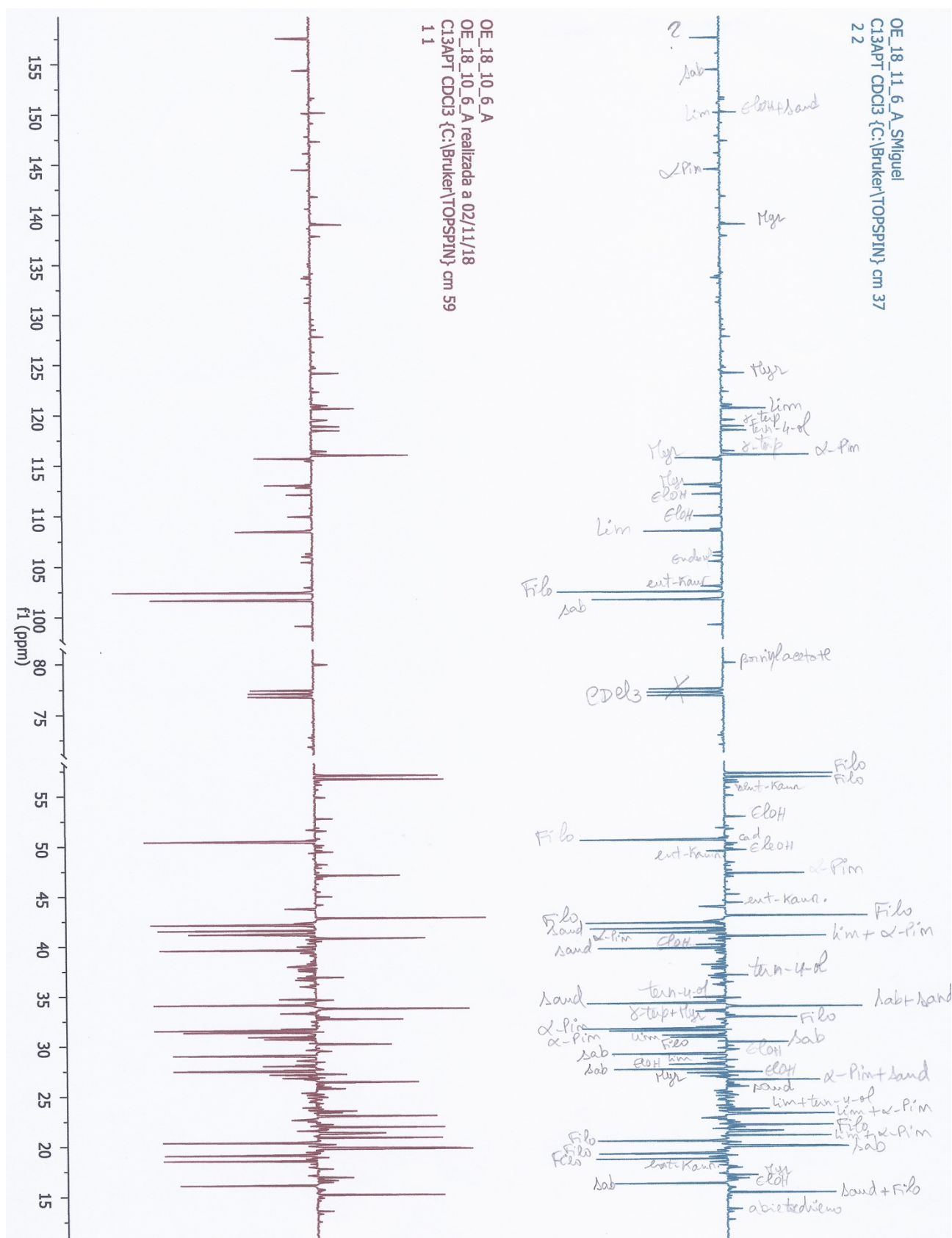


Figura 2- Comparação dos espectros de ^{13}C RMN (APT) do OE de **18116A** e **18106A**, da ilha de São Miguel em em CDCl_3 (δ 10 –170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: **α -Pin**- α -Pineno; **Sab** – Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr** – Mirceno; **α - e γ -Terp**– Terpineno; **Tern-4-ol**- Terpinen-4-ol; **Cad**- Cadinol; **Emol**- Elemol; **Filo**- Filocladeno; **ent-Caur**- ent-Caureno; **Sand**- Sandaracopamaradieno; bornyl acetate- Acetato de bornilo.

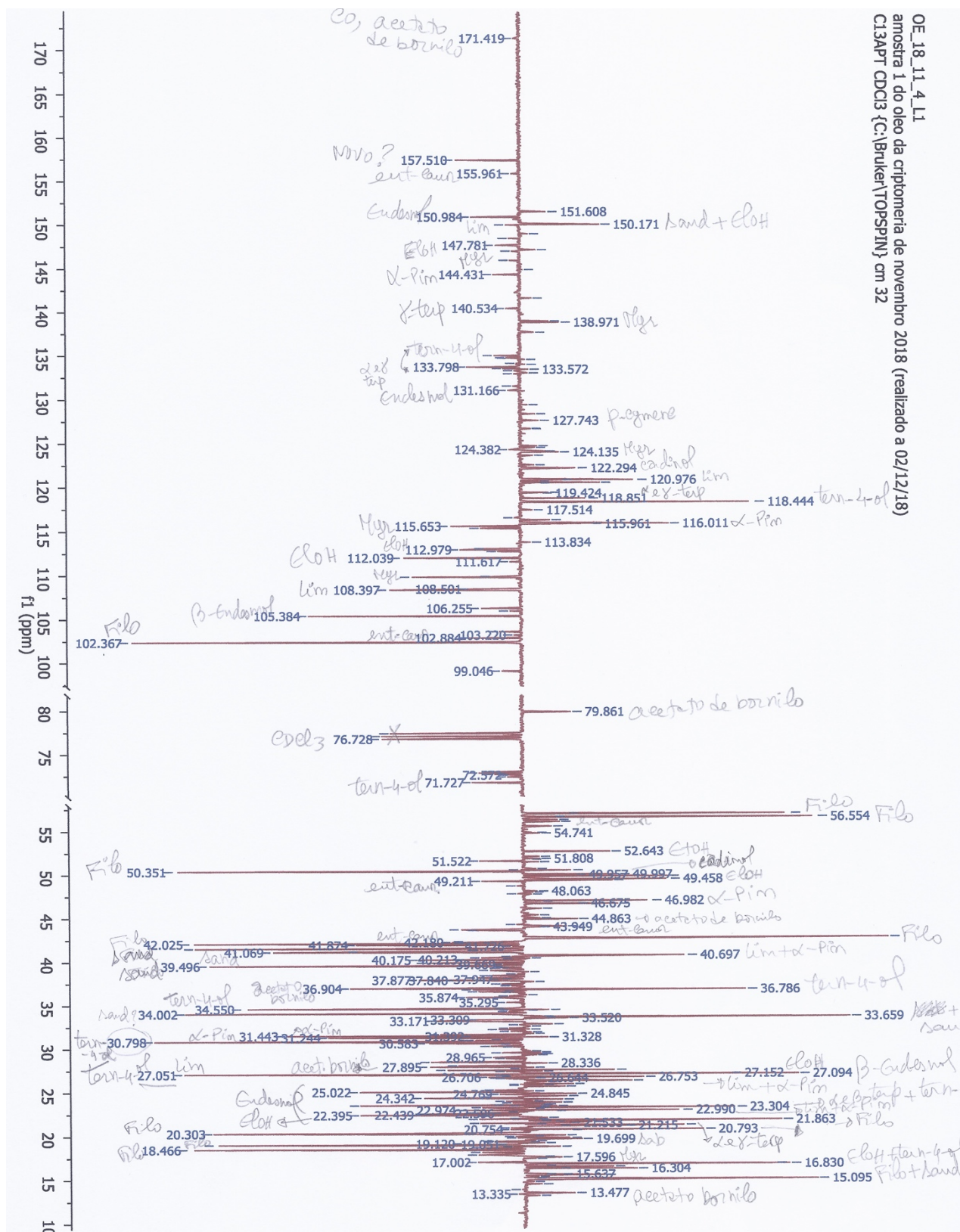


Figura 3- Espectro de ^{13}C RMN (APT) do OE 18114L1 da ilha Terceira em CDCl_3 (δ 10 – 170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: **α-Pin**– α -Pineno; **Sab**– Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr**– Mirceno; **γ-Ter**– γ -Terpineno; **Tern-4-ol**– Terpinen-4-ol; **EIOH**– Elemol; **Filo**- Filocladeno; **ent-Caur**– ent-Caureno; **Sand**– Sandaracopamaradieno; Cadinol; Eudesmol; Acetato de bornilo.

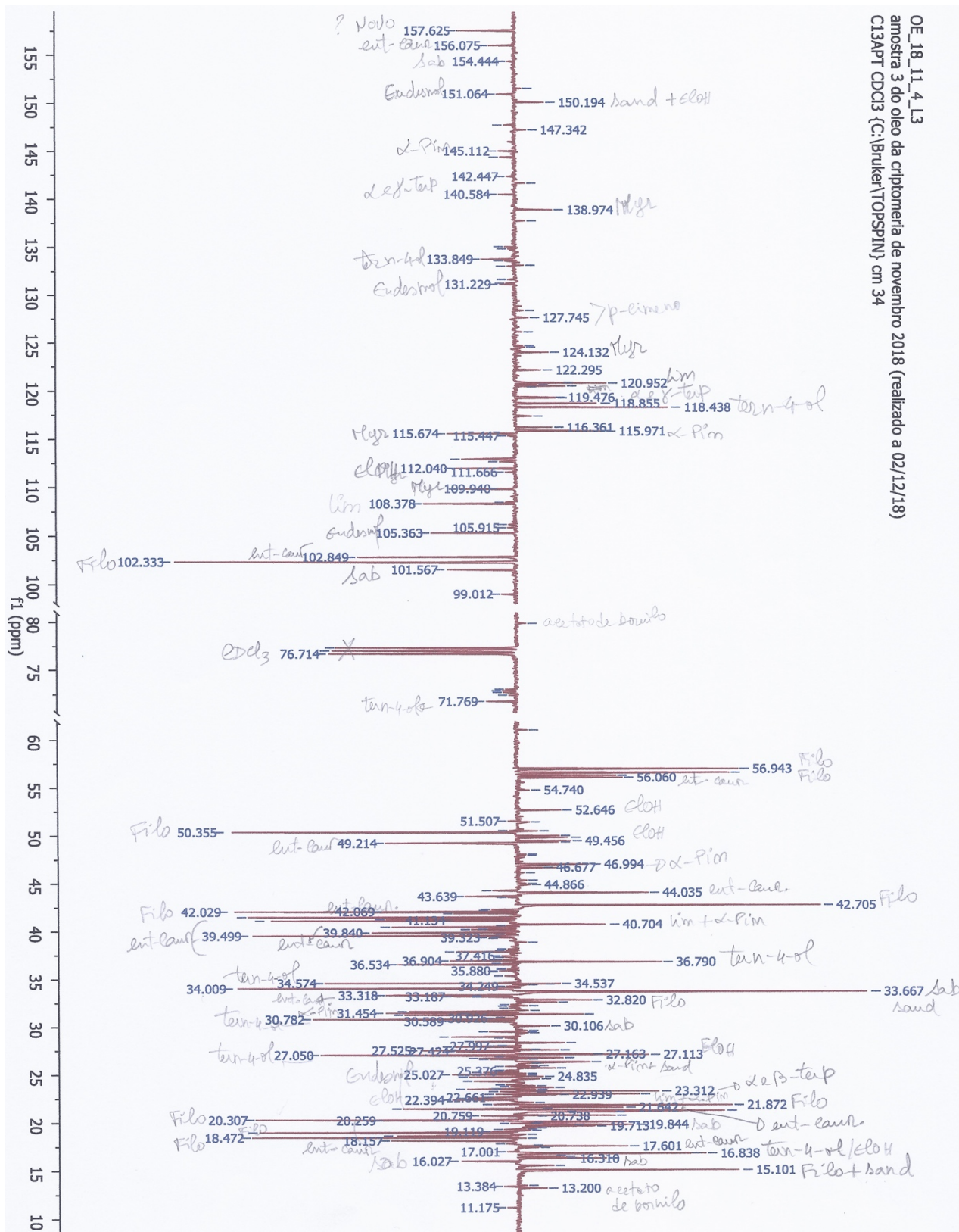


Figura 4- Espectro de ^{13}C RMN (APT) do OE 18114L3, da ilha Terceira, em CDCl_3 (δ 10 – 170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: α -Pin– α -Pineno; Sab– Sabineno; Lim – Limoneno; Myr– Mirceno; α - e γ -Terp– Terp– γ -Terpineno; Tern-4-ol– Terpinen-4-ol; EIOH– Elemol; Filo– Filocladeno; ent-Caur– ent-Caureno; Sand–Sandaracopamaradieno; Eudesmol; Acetato de bornilo.

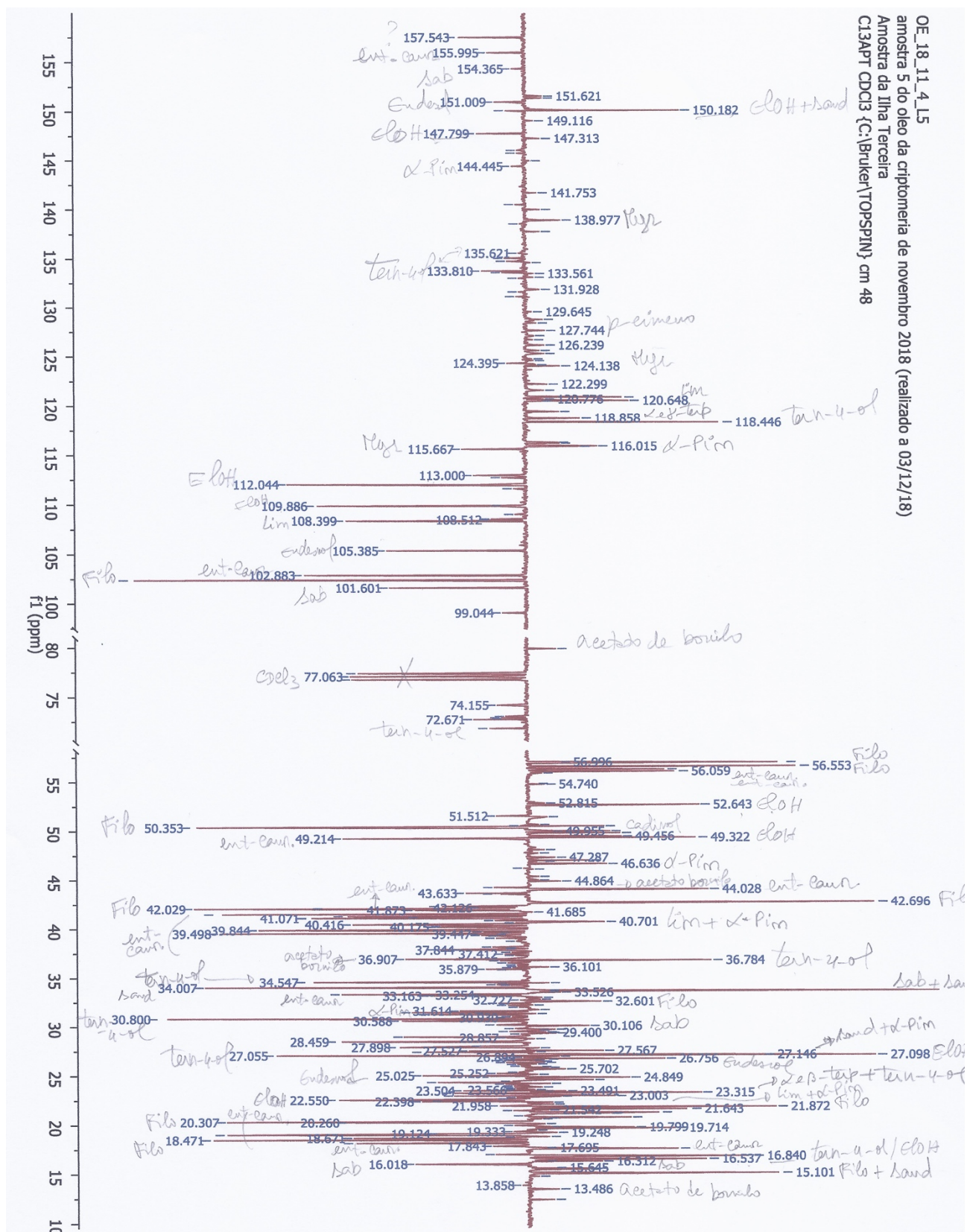


Figura 6- Espectro de ^{13}C RMN (APT) do OE 18114L5, da ilha Terceira, em CDCl_3 (δ 10 – 170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: α -Pin- α -Pineno; Sab- Sabineno; Lim - Limoneno; Myr- Mirceno; α - e γ -Terp- γ -Terpineno; Tern-4-ol- Terpinen-4-ol; EIOH- Elemol; Filo- Filocladeno; ent-Caur- ent-Caureno; Sand- Sandaracopamaradieno, Eudesmol e Acetato de bornilo.

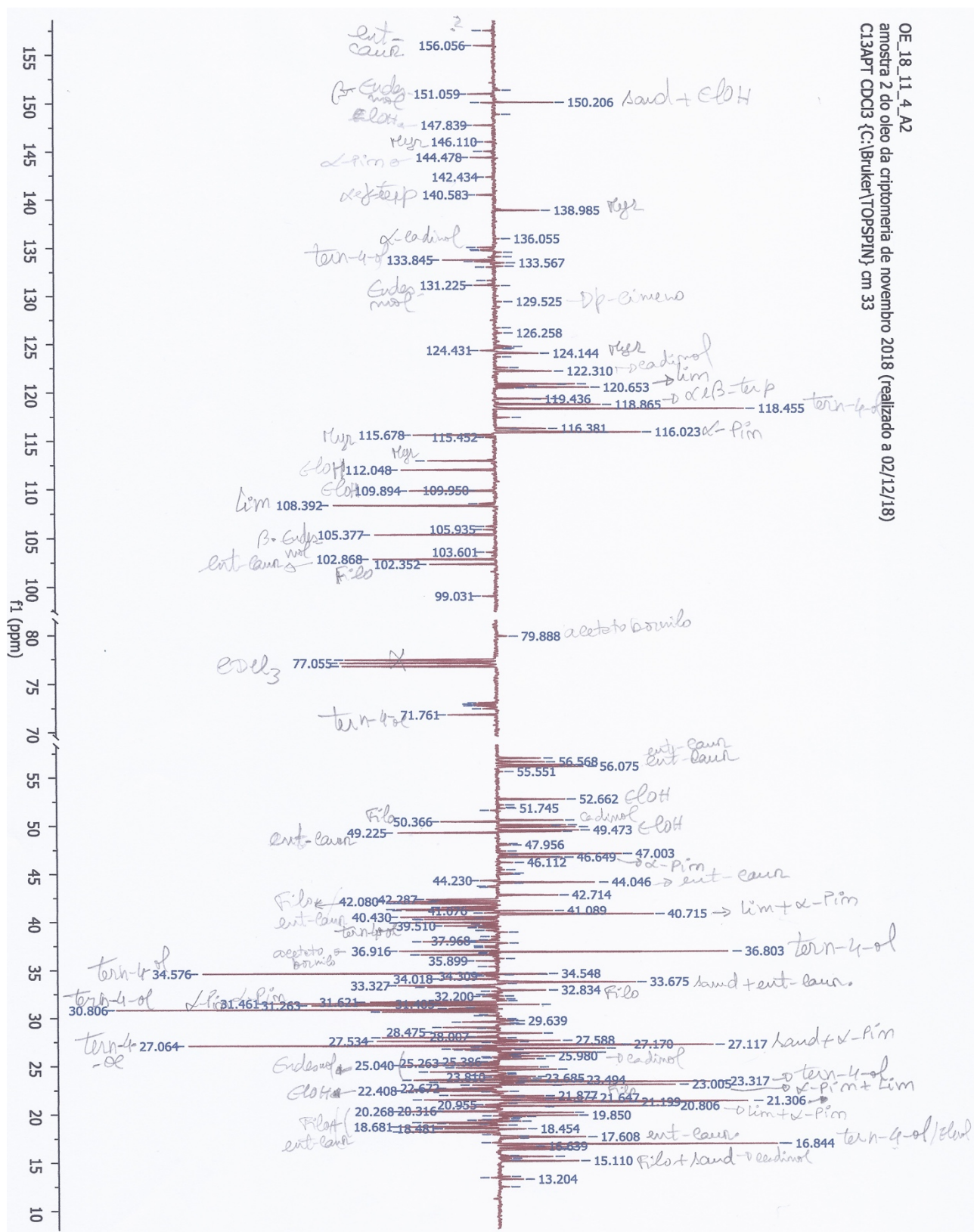


Figura 7- Espectro de ¹³C RMN (APT) do OE 18114A2 da ilha Terceira em CDCl₃ (δ 10 – 170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: **α-Pin-** α-Pineno; **Sab-** Sabineno; **Lim** – Limoneno; **Myr-** Mirceno; **α- e γ-Terp-** γ-Terpineno; **Tern-4-ol-** Terpinen-4-ol; **EIOH-** Elemol; **Filo-** Filocladeno; **ent-Caur-** ent-Caureno; **Sand-** Sandaracopamaradieno, Eudesmol; Cadinol e Acetato de bornilo.

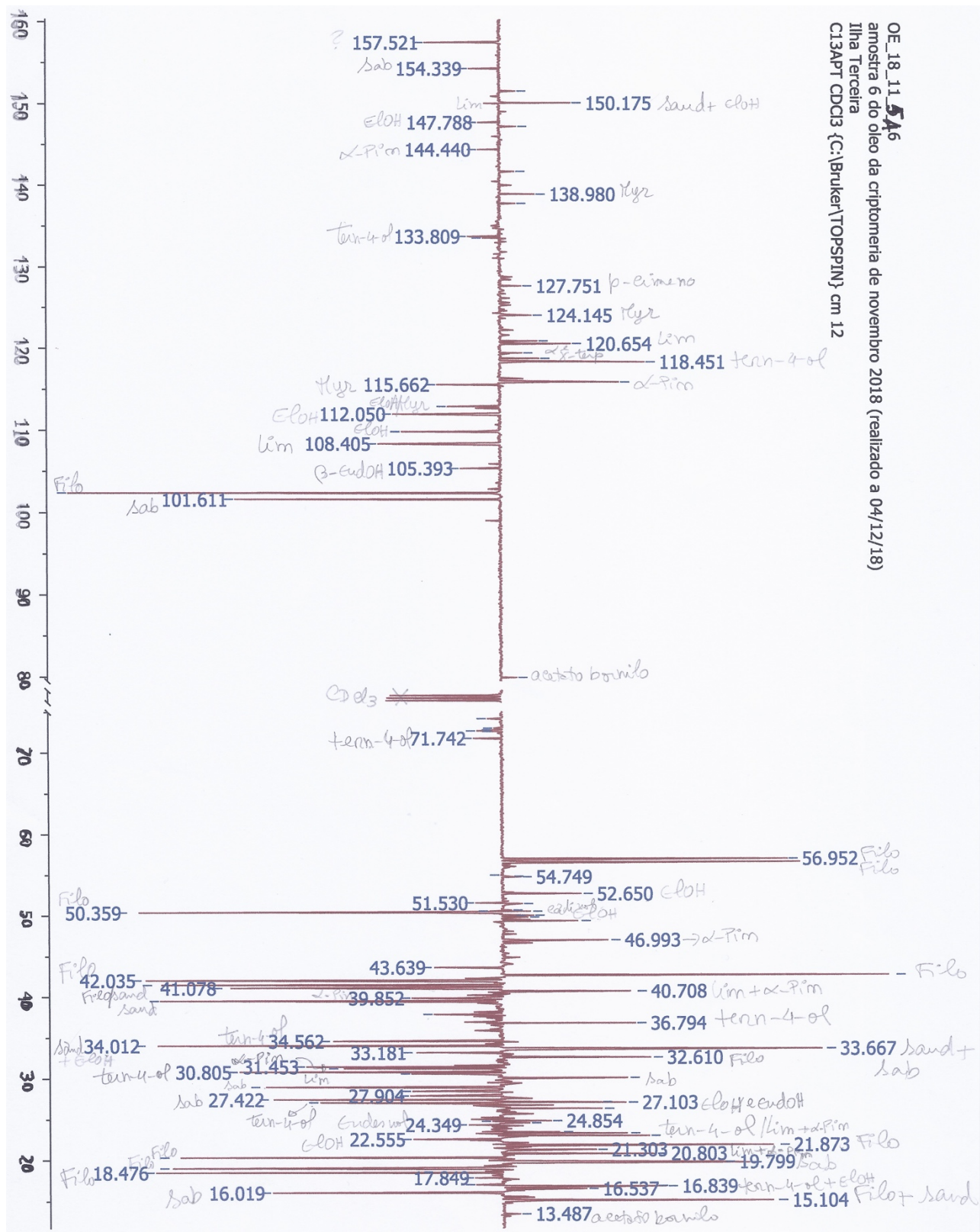


Figura 8- Espectro de ^{13}C RMN (APT) do OE 18115A6, da ilha Terceira, em CDCl_3 (δ 10 – 170 ppm). Aparelho de RMN de 400 MHz. Identificação dos compostos: α -Pin- α -Pino; Sab- Sabineno; Lim – Limoneno; Myr– Mirceno; α - e γ -Ter- γ -Terpineno; Tern-4-ol– Terpinen-4-ol; EIOH– Elemol; Filo- Filocladeno; ent-Caur– ent-Caureno; Sand– Sandaracopamaradieno, Eudesmol; Cadinol e 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: Espigão, Água de pau, Lagoa, São Miguel, Azores (**4A**); Achadinha, Northeast, São Miguel, Azores, (**6A**) (Woods ca. 50 years); Três Cantos, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Azores (**4L1**); Viveiro Florestal da Falca/são Bartolomeu, Angra do Heroísmo, Terceira, Azores (**4A2**); Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Azores (**4L3**); Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Azores (**4L4**); Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira, Azores (**4L5**); Encosta do Pico Alto/Aqualva, Praia da Vitória, Terceira, Azores (**5A6**), Portugal.

Type of forest: Cultivar or spontaneous (natural regeneration)

Production Year / production month: 2018 / 11

Quota: 4, 5 and 6

Type of soils: Andosols (A) and Lithosols

Part of plant: Aerial parts – tree branches; tree branches with cones (RB+E)

Extraction procedure: Steam-distillation and *Clevenger* hydrodistillation (CH)

Sample: 8 Essential Oils (EOs); **4A** and **6A** from São Miguel Island; **4L1**, **4L3**, **4L4**, **4L5**, **4A2** and **5A6** from Angra do Heroísmo, Terceira Island.

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

Code (Year; month; quota; soil type; sample number)	Plant processing (Plant state)	Type of forest	Extraction Method	Distillation time (h:min)	Yield (%, v/w)
18114A	Uncut branches; RB+E (Floral)	Cultivar	Steam-distillation	2:05	0.32
18116A	Uncut branches; RB+E (Floral)	Cultivar	Steam-distillation	2:05	0.22
18114L1	Uncut branches; RB+E (Floral)	Cultivar	CH, 3 days after collection	1:33	0.17
18114L3	Uncut branches (juvenile)#	Spontaneous [§]	CH, 4 days after collection	1:40	0.39
18114L4	Uncut branches (juvenile)#	Spontaneous [§]	CH, 6 days after collection	1:43	0.40
18114L5	Uncut branches (juvenile); R bottom*	Cultivar [§]	CH, after collection	1:43	0.29
18114A2	Uncut branches (juvenile)	Cultivar	CH, 3 days after collection	2:00	0.09
18115A6	Uncut branches (juvenile); R bottom*	Spontaneous	CH, 2 days after collection	1:43	0.40

#Plants of natural regeneration (spontaneous); *R bottom- branches collected of the bottom part tree; CH- Clevenger Hydrodistillation;

[§]Cryptomeria from Veredas, Terra Chã, Angra do Heroísmo, Terceira.

Eight samples of *C. japonica* EOs, representative of November 2018 provided by Azorina S.A., were analyzed by the ^{13}C NMR technique concurrently with the GC and GC-MS analyzes. Thus, following the same procedure used for the other samples from previous months, a comparative analysis of the chemical constituents of the two EOs from São Miguel island (**4A** and **6A**) and six EOs from Angra do Heroísmo, Terceira island was progressed.

The ^{13}C RMN chemical profiles from November EOs **18114A** from uncut tree branches mix with male cones of the same quote and region of the São Miguel island in comparison with October EO **18104A** are similar. However, the EO **18114A** contains a slightly minor amount of phyllocladene and a slightly increase of *ent*-kaurene and α -pinene with significant rise of limonene. Similar to the previous month in this EO are also detected some oxidized compounds but in reduced percentages (Annex, Figure 1).

The ^{13}C RMN chemical profile of November EO **18116A** from uncut tree branches mix with male cones of the same quote and region of the São Miguel island is similar with EO of the previous month (**18106A**), with no variation in the percentage of oil constituents (Annex, Figure 2).

For the first time, six OEs of Terceira Island were analyzed, which were obtained by Clevenger hydrodistillation from tree branches of *Cryptomeria* that grew in lithosols, at quote of 400 m, via cultivar or natural regeneration (4L1, 4L3, 4L4 e 4L5) and plants that grew in andosols by cultivar or spontaneous generation at 400 and 500 m of quotes respectively (4A2 and 5A6).

In contrast with São Miguel island EOs, the EO **18114L1** from uncut tree branches mix with male cones of *cryptomeria* cultivated in Três Cantos, Terra Chã, contains high quantities of phyllocladene and terpinen-4-ol and minor amounts of α -pinene and limonene. In this EO was also identified elemol, eudesmol isomers, bornyl acetate, myrcene, α - e β -terpinene, sandacopamaradiene, cadinol, and sabinene and *ent*-kaurene as vestigial compounds (Annex, Figure 3).

OE18114L3 and **OE18114L4** from juvenile branches of spontaneous *cryptomeria* that grew in Veredas, Terra Chã, displayed a great variation in its constituent percentages however, this oils differentiated only by the time between collect and hydrodistillation procedures.

OE18114L3 extracted 4 days after collected, contains phyllocladene, *ent*-kaurene, elemol, eudesmol, terpinen-4-ol, limonene, sandaracopamaradiene, myrcene, α - e β -terpinene, α -pinene and sabinene, with the last two monoterpenes in reduced amounts (Annex, Figure 4).

OE18114L4 extracted 6 days after collected, is mainly composed of *ent*-kaurene followed of terpinen-4-ol, limonene, elemol, sabinene and vestiges of phyllocladene (Annex, Figure 5).

The chemical profile of the **OE18114L5**, hydrodestillated from branches of cultivated *cryptomeria* in Veredas, Terra Chã, is similar to **EO18114L3** being the first EO enriched in elemol, phyllocladene, *ent*-kaurene, limonene and terpinene-4-ol with minor percentage of α -pinene and sabinene (Annex, Figure 6).

Relatively to EOs from *cryptomeria* that grew in andosols were hydrodestillated branches of juvenile plants from Falca nursery at 400m of quota, **OE18114A2** and branches from spontaneous plants (ca. 30 years old) in Praia da Vitória at 500 m of quota, **OE18115A6**.

OE18114A2 contains low percentages of diterpenes, *ent*-kaurene and phyllocladene, with the last half of the first. In comparison with São Miguel EOs the monoterpene percentages, α -pinene e sabinene is also reduce with this last almost non-existent. Reasonable quantities of terpinen-4-ol, elemol and limonene, eudesmol isomers, sandaracopamaradiene, myrcene, α -cadinol, α - e β -terpinene, bornil acetate are also constituents of this EO (Annex, Figure 7).

In contrast to **OE18114A2**, the **OE18115A6** contains a great quantity of phyllocladene with absence of *ent*-kaurene. Sabinene and α -pinene were detected in similar quantities and the same were observed to terpinen-4-ol, elemol and limonene (Annex Figure 8).

In conclusion, EOs of November 2018 extracted by *Clevenger* apparatus from different regions of Terceira Island were distinct of São Miguel OEs from cryptomeria forest (ca. de 30 a 40 years old) extracted by steam-distillation industrial process.

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



GOVERNO
DOS AÇORES



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu de
Desenvolvimento Regional