



UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE
Centre de recherche UMR CNRS 6134 (SPE)



**Thèse présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN CHIMIE**
Mention : Chimie théorique, physique, analytique

Soutenue publiquement par

ANNE-MARIE NAM

le 21 mars 2014

**Contribution de la RMN ¹³C à l'analyse
des huiles végétales, huiles essentielles et résines
(*Olea europaea*, *Pinus halepensis* et *Cedrus atlantica*)**

Directeurs :

M. Ange BIGHELLI, Professeur, Université de Corse
M. Félix TOMI, Professeur, Université de Corse

Rapporteurs :

M. Pierre Giampaoli, Professeur, Centre de Massy AgroParisTech
M. Hichem Ben Jannet, Professeur, Université de Monastir

Jury

M. Nicolas Baldovini, MC, Université de Nice Sophia Antipolis
M. Joseph Casanova, Professeur émérite, Université de Corse
M. Pierre Giampaoli, Professeur, Centre de Massy AgroParisTech
M. Hichem Ben Jannet, Professeur, Université de Monastir
M. Ange BIGHELLI, Professeur, Université de Corse
M. Félix TOMI, Professeur, Université de Corse

RÉSUMÉ

Les produits issus de la biomasse végétale connaissent depuis quelques années un succès grandissant dans de nombreuses industries (aromathérapie, cosmétique, parfums, etc.). L'objectif de notre étude était, d'une part de contribuer au développement des méthodes d'identification et de quantification des constituants des mélanges naturels par RMN ^{13}C et RMN ^1H (par exemple le squalène dans l'huile d'olive), et d'autre part, de contribuer à la caractérisation chimique de deux conifères introduits en Corse, le pin d'Alep (huile essentielle) et le cèdre de l'Atlas (huile essentielle, huile pyrolytique et résine).

La première partie concerne la quantification du squalène présent dans l'huile d'olive. En effet, ce triterpène linéaire participe à la stabilité oxydative de l'huile d'olive et joue un rôle important dans la réduction des risques de certains cancers. Il s'agissait de mettre au point un protocole expérimental basé sur la RMN ^1H ou ^{13}C en utilisant un appareil de routine (9,4 Tesla). La quantification par RMN ^{13}C s'est avérée fiable et elle a été appliquée à la quantification du squalène dans 25 échantillons d'huile d'olive de Corse.

La seconde partie de nos travaux concerne la caractérisation chimique de l'huile essentielle de pin d'Alep introduit dans trois stations de Corse (Capo di Feno, Saleccia et Tre Padule de Suartone). L'analyse détaillée de l'huile essentielle de cônes, par combinaison des techniques chromatographiques et spectroscopiques, a permis d'identifier 48 composés. La composition chimique est largement dominée par les monoterpènes (α -pinène et myrcène) et un sesquiterpène oléfinique ((E)- β -caryophyllène). La RMN ^{13}C a permis d'identifier divers diterpènes, dont le 8,12-époxy-14-labdèn-13-ol. Ce composé est décrit pour la première fois dans l'huile essentielle de pin d'Alep. L'analyse de 15 échantillons d'huile essentielle de cônes a mis en évidence trois types de compositions : α -pinène ; myrcène ; α -pinène/myrcène. Enfin, l'analyse de 47 échantillons d'huile essentielle d'aiguilles, associée à un traitement statistique des données (ACP, AFD), a permis de mettre en évidence une variabilité chimique intraspécifique. Ainsi, les échantillons se répartissent en trois groupes selon leur teneur en (E)- β -caryophyllène (groupe I), en E- β -caryophyllène/ α -pinène/myrcène (groupe II) et en myrcène (groupe III).

La dernière partie a été consacrée à l'étude de *Cedrus atlantica*. L'analyse détaillée d'une huile essentielle commerciale (du Maroc) a permis d'identifier 20 constituants, les composés majoritaires sont les α -, β - et γ -himachalène. Par ailleurs, 7 composés absents de notre bibliothèque de données spectrales ont été identifiés par RMN ^{13}C . Les compositions chimiques des huiles pyrolytiques artisanales du Maroc sont également dominées par les himachalènes et la (E)- α -atlantone. Enfin, nous avons réalisé l'analyse qualitative et quantitative par RMN ^{13}C , sans séparation préalable, de 28 échantillons de résine de *C. atlantica* récoltés dans les 5 forêts de Corse référencées par l'ONF (Bavella, Bonifato, Ospedale, Pineta et Vizzavona). A côté des acides résiniques, nous avons également identifié 3 lignanes (pinorésinol, laricirésinol et 9-acétate de laricirésinol). Pour l'ensemble de ces composés, nous avons mis en évidence trois types chimiques. Enfin, nous avons mis au point et validé un protocole expérimental de quantification des lignanes par RMN ^1H .

Discipline : Chimie organique et analytique

Mots clés : Analyse des mélanges complexes naturels, Huiles essentielles, Huiles pyrolytiques, Huiles d'olives, Oléorésines, RMN ^{13}C , RMN ^1H , Squalène, Lignanes, *Olea europaea*, *Pinus halepensis*, *Cedrus atlantica*

ABSTRACT

Natural products isolated from plants acquired, in recent years, a growing success in many industries (aromatherapy, cosmetic, perfumes). The objective of our study was to contribute, on the one hand, to the development of methods involving ^{13}C and ^1H NMR for the identification and quantification of the components of natural mixtures, and on the other hand, to the chemical characterization of two conifers brought to Corsica, Aleppo pine (essential oil) and atlas cedar (essential oil, pyrolysis oil and resins).

The first part concerned the quantification of squalene present in olive oil. Indeed, linear triterpene participated in the oxidative stability of olive oil and play an important role by decreasing some kind of cancers risks. It's deal with to elaborate an experimental part based on NMR ^1H and ^{13}C by using routine apparatus (9.4 Tesla). Quantification by NMR ^{13}C is reliable and have been applied to squalene quantification in 25 samples of Corsican olive oil.

The second part of our work concerned the chemical characterization of the essential oil of Aleppo pine brought to Corsica in three different stations (Capo di Feno, Saleccia and Tre Padule de Suartone). A detailed analysis of cone essential oil, using the combination of chromatographic and spectroscopic techniques, leads to the identification of 48 compounds. Chemical composition is extensively dominated by monoterpens (α -pinene and myrcene) and one olefinic sesquiterpen (*(E)*- β -caryophyllene). ^{13}C NMR allowed to the identification of various diterpens, particularly the 8,12-epoxy-14-labden-13-ol. This compound is described for the first time in aleppo pine essential oil. Fifteen samples of cone essential oil were analysed allowing differentiating three kinds of compositions: α -pinene; myrcene; α -pinene/myrcene. Finally, analysis of 47 samples of needles essential oil, associated with statistical treatment of the results (PCA and PFA), suggested the occurrence of an intraspecific chemical variability. Samples are divided into three groups, based on their high contents in *(E)*- β -caryophyllene (groupe I), in *(E)*- β -caryophyllene/ α -pinene/myrcene (groupe II) and in myrcene (groupe III).

The last part concerned the study of *Cedrus atlantica*. A detailed analysis of commercial essential oil leads to the identification of 20 constituents. Main compounds are α -, β - and γ -himachalene. Moreover, seven compounds, not yet referenced in our home-made NMR spectral data library, were identified by NMR ^{13}C . Chemical compositions of handwork pyrolysis oils from Morocco were also dominated by the himachalene's and *(E)*- α -atlantone. Qualitative and quantitative analysis of 28 samples of *Cedrus atlantica* resins, obtained from the five Corsican forests referenced by the Office National des Forêts of Corsica (Bavella, Bonifato, Ospedale, Pineta and Vizzavona) have been done, without any step of chromatography. Beside resinic acids, we have been identified three lignans (pinoresinol, lariciresinol and lariciresinol-9-acetate). Qualitative and quantitative analysis of these compounds, leads to the occurrence of three types of chemical composition. Finally, we have developed and validated a method for quantification of lignans by ^1H NMR.

Discipline: Organic and analytical chemistry

Key words: Natural mixture analysis, Essential oil, Pyrolysis oil, Olive oil, Oleoresins, ^{13}C NMR, ^1H NMR, Squalene, Lignans, *Olea europaea*, *Pinus halepensis*, *Cedrus atlantica*

RIASSUNTU

I prudutti esciuti da a biomassa vegetale cunnoscenu dapoi qualch'anni un successu criscente inde industrie numerose (aromaterapia, cosmetiche, muschi,...) L'ogettivu di u nostru studiu era di cuntribuisce: d'un cantu, à u sviluppu di metodi d'identificazione è di quantificazione di i custituenti di l'imbuleghji naturali per RMN ^{13}C è RMN ^1H (esempiu u squalène di l'oliu d'aliva) è d'un altru, à a caratterisazione chimica di dui cuniferi intruiti in Corsica : u pinu d'Alep (oliu essenziale) è u cedru di l'Atlas (oliu essenziale, oliu piroliticu è rasgia).

A prima parte, cuncerna a quantificazione di u squalène presente in l'oliu d'aliva. Di fatti, issu triterpene lineariu participa à a stabilità ossidativa di l'aliva è ghjoca un rollu maiò in a riduzione di i risichi di certi cancri. Era di primura di mette à u puntu un prutucollu sperimentale appughjatu à u RMN ^1H o ^{13}C ghjuvendusi d'un apparechju di pratica (9,4 Tesla). A quantificazione da RMN ^{13}C hà fattu prova d'affibilità è hè stata appiccata à a quantificazione di u squalène in 25 campioni d'oliu d'aliva di Corsica.

A seconda parte di i nostri lavori cuncerna a caratterisazione chimica di l'oliu essenziale di u pinu d'Alep fattu entre in tre stazione di Corsica (Capo di Feno, Saleccia, Tre Padule di Suartone). L'analisa stagliata di l'oliu essenziale di pignotti per associu di e tecniche cromatografiche è spettroscopiche hà permessu d'identificà 48 cumposti. A cumposizione chimica hè di modu largu supranita da i monoterpeni (α -pinene è myrcene) è un sesquiterpene olifinicu ((E)- β -caryophyllene). A RMN ^{13}C hà permessu d'identificà diterpene svariati per un cità chè u 8,12-époxy-14-labden-13-ol. Stu cumpostu hè discritu per a prima volta in l'oliu essenziale di pinu d'Alep. L'analisa di 15 campioni d'oliu essenziale di pignotti hà messu in risaltu tre tippi di cumposizione : α -pinene, myrcene è α -pinene/myrcene. Infine, l'analisa di 47 campioni d'oliu essenziale di pinacule associatu à un trattamentu statisticu di e date (ACP, AFD), hà permessu di mette in risaltu una variabilità chimica intraspecifica. Cusi, i campioni si scumpertenu in tre gruppi in funzione di a so prupuzione in (E)- β -caryophyllène (Gruppu I), (E)- β -caryophyllène/ α -pinène/myrcène (Gruppu II) è myrcène (Gruppu III).

L'ultima parte, hè stata cunsacrata à u studiu di *Cedrus atlantica*. L'analisa stagliata d'un oliu essenziale commerciale (di u Maroccu) hà permessu d'identificà 20 cumponenti. I cumposti maghjuraritarii (di primura) essendu i α -, β - è γ -himachalène. D'altronde, 7 cumposti mancanti di a nostra biblioteca di date spettrale sò stati identificati per RMN ^{13}C . E cumposizioni chimiche di l'olii pirolitichi artigianali di u Maroccu sò anch'elli supraniti per i himachilènes è a (E)- α -atlantone. Infine, emu realizatu l'analisa qualitativa è quantitativa per RMN, senza staccanza preliminarina, di 28 campioni di rasgia (pece) di *C. atlantica* raccolti in e 5 fureste di Corsica referenziate da l'ONF (Bavella, Bonifatu, Ospedale, Pineta è Vizzavona). Accantu di l'aciti rasgianinchi, avemu ancu identificati 3 lignanes (pinorésinol, laricirésinol è 9-acétate de laricirésinol). Per issi cumposti adduniti, emu messu in risaltu 3 tippi chimichi. Infine, emu messu à u puntu è valutatu un prutucollu sperimentale di quantificazione di i lignanes per RMN ^1H .

Disciplina : Chimia urganica è analitica

Parulle chjave : Analisa di l'imbuleghji cumplicati naturali, olii essenziale, olii pirolitichi, olii d'alivi, oleorasginchi, RMN ^{13}C , RMN ^1H , Squalène, lignanes, *Pinus halepensis*, *Olea europaea* *Cedrus atlantica*.