



**Valorisation de l'écorce de *Picea mariana* par la
production d'extraits naturels : les extraits aqueux
et l'huile essentielle**

Thèse

Nellie Francezon

Doctorat en Sciences du Bois
Philosophiæ Doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Nellie Francezon, 2018

**Valorisation de l'écorce de *Picea mariana* par la
production d'extraits naturels : les extraits aqueux
et l'huile essentielle**

Thèse

Nellie Francezon

Sous la direction de :

Tatjana Stevanovic, directrice de recherche

Résumé

L'épinette noire *Picea mariana* est une essence abondamment exploitée au Québec pour la qualité de son bois de charpente. Sa transformation par les scieries génère, en conséquence, d'énormes volumes d'écorces résiduelles. Dans un objectif de transformation de la ressource et de conception de produits et systèmes innovants, ce projet de doctorat a permis de développer un procédé de conversion de la biomasse forestière pour la valorisation complète de l'écorce de l'épinette noire, en utilisant des solvants respectueux de l'environnement. Ce procédé intègre deux types d'extractions différentes : l'hydrodistillation et l'extraction à l'eau chaude. Ainsi il produit simultanément trois extraits naturels, l'huile essentielle et l'hydrolat capturant la fragrance de l'épinette et l'extrait aqueux brut riche en polyphénols antioxydants.

L'élucidation de la composition chimique de l'huile essentielle et de l'hydrolat d'écorce de l'épinette noire a mis en évidence plus de cinquante composés volatils et aromatiques appartenant à la famille des terpénoïdes. De plus, la fragrance de l'huile essentielle est très différente de celle produite industriellement à partir des aiguilles. Elle pourrait ainsi constituer un nouveau produit pour les secteurs de la parfumerie et des arômes. L'extrait brut aqueux, quant à lui, est riche en polyphénols antioxydants, en tanins et en sucres. Les composés phénoliques de faibles masses moléculaires appartiennent majoritairement à la famille des stilbènes dont les *trans*-isorhapontine, *trans*-resvératrol, *trans*-picéide et *trans*-astringine. Deux nouvelles molécules ont également été découvertes dans cet extrait : deux stéréoisomères de stilbènes, appelés picéasides O et P. Dans le but de récupérer ces molécules d'intérêt en plus grande quantité, une optimisation de l'extraction aqueuse a été réalisée pour établir les meilleurs paramètres d'extraction. La température 80 °C et le ratio écorce/eau 50 mg/mL ont été déterminés comme étant les paramètres les plus efficaces pour enrichir l'extrait aqueux en polyphénols d'intérêt, grâce à une approche statistique impliquant la chimiométrie.

Ainsi, trois produits à haute valeur ajoutée sont disponibles à partir de l'écorce de l'épinette noire. Mais le plus pertinent au niveau industriel, c'est qu'ils peuvent être extraits simultanément via le procédé intégré dont le développement a permis de valider les

rendements et les compositions chimiques tout en garantissant la disponibilité des écorces résiduelles pour la combustion.

Ce projet de doctorat permet d'offrir une solution de gestion efficace des coproduits de transformation du bois par le biais d'un procédé vert produisant trois produits naturels à haute valeur ajoutée. Les extraits riches en polyphénols constitueraient de nouveaux ingrédients naturels potentiels pour les secteurs cosmétiques et de santé nutrition, en tant qu'actifs pour la peau ou compléments alimentaires antioxydants. De plus, les molécules d'intérêt thérapeutique comme le resvératrol et ses dérivés identifiés dans l'extrait aqueux seraient de bons candidats pour l'industrie pharmaceutique. Enfin, l'huile essentielle et l'hydrolat pourraient enrichir la palette du parfumeur ou être employés en tant qu'arômes.

Abstract

The transformation of black spruce *Picea mariana*, abundantly operated for the quality of its lumber in Quebec, generates huge volumes of residual bark in sawmills. With the objective of transforming the resource and designing innovative products and systems, this doctoral project has developed a process for converting forest biomass through the complete conversion of black spruce bark, using eco-friendly solvents. This process incorporating two different types of extractions (hydrodistillation and hot water extraction) simultaneously produces three natural extracts, the essential oil and hydrosol capturing the fragrance of black spruce and the hot water extract enriched with antioxidant polyphenols.

The elucidation of the chemical composition of black spruce bark essential oil and hydrosol has revealed more than fifty volatile and aromatic compounds belonging to the terpenoid family. In addition, the fragrance of the essential oil is very different from the one produced industrially from the needles. It could thus constitute a new product for the perfume and aroma sectors. The aqueous crude extract, on the other hand, is rich in antioxidant polyphenols, tannins and sugars. Phenolic compounds of low molecular weight mainly belong to the stilbene family, including *trans*-isorhapontin, *trans*-resveratrol, *trans*-piceide and *trans*-astringin. Two new molecules have also been discovered in this extract: two stereoisomers of stilbene, called piceasides O and P. In order to optimally recover these molecules of interest, an optimization of the hot water extraction has made it possible to highlight the best extraction parameters. Thanks to a statistical approach involving chemometrics, the temperature 80 °C and the bark/water ratio 50 mg/mL were determined to be the most effective parameters for enriching the aqueous extract with polyphenols of interest.

Thus, three high value-added products are extractable from the bark of black spruce. But the most interesting at an industrial level is that they can be extracted simultaneously via the integrated process whose development has validated the yields and chemical compositions while ensuring the availability of residual bark for combustion.

This doctoral project offers a solution for an efficient management of co-products of wood processing through a green process, producing three natural products with high added value.

The cosmetic and health nutrition sectors, constantly in search of new natural ingredients, may be interested in marketing these extracts as skin actives or as antioxidant dietary supplements. Molecules of therapeutic interest such as resveratrol and its derivatives identified in the aqueous extract could also be used by the pharmaceutical industry. Essential oil and hydrosol could enrich the perfumer's palette or be used as aromas.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Liste des figures.....	xi
Liste des tableaux	xiii
Liste des abréviations	xiv
Remerciements	xviii
Avant-propos	xix
Introduction	1
Chapitre 1 Revue de littérature.....	3
1.1. Les écorces.....	3
1.2. Les extractibles forestiers	3
1.3. Les terpénoïdes	4
1.3.1. L'oléorésine, la source des terpénoïdes.....	5
1.3.2. Voie de biosynthèse.....	6
1.3.3. Les monoterpénoïdes.....	7
1.3.4. Les sesquiterpénoïdes.....	10
1.3.5. Les diterpénoïdes.....	11
1.3.6. Les triterpénoïdes et tétraterpénoïdes.....	13
1.4. Les composés phénoliques	14
1.4.1. Voies de biosynthèse.....	14
1.4.2. Les phénols et acides phénols	16
1.4.3. Les stilbènes	17
1.4.4. Les lignanes et néolignanes	20
1.4.5. Les flavonoïdes.....	21
1.4.6. Les tanins.....	24
1.5. Les méthodes d'extraction.....	26
1.5.1. Extraction des molécules hydrophobes : les terpènes volatils	26
1.5.2. Extraction des molécules hydrosolubles : les polyphénols	31
1.5.3. Paramètres influençant l'extraction.....	32
1.6. Les extraits d'épinette noire.....	33

1.6.1. Extraits polyphénoliques	33
1.6.2. Huiles essentielles et extraits lipophiles	36
1.7. Valorisation de la biomasse forestière	38
1.8. Objectifs de la recherche	39
Chapitre 2 Méthodologies	41
2.1. Préparation et conditionnement du matériel végétal	41
2.2. Les procédés	41
2.2.1. Hydrodistillation et conception du procédé intégré	41
2.2.2. Optimisation de l'extraction à l'eau chaude.....	43
2.3. Méthodes d'analyses chimiques	45
2.3.1. Analyses chimiques des huiles essentielles et hydrolats	45
2.3.2. Analyses chimiques des extraits aqueux	50
2.3.3. Mesure de la capacité antioxydante.....	59
2.3.4. Pouvoir calorifique supérieur	60
Chapitre 3 Les résines et huiles essentielles de conifères : composition chimique et applications	62
Résumé	63
Abstract.....	64
3.1. Introduction	65
3.2. Oleoresin from conifers of temperate zone	65
3.2.1. Resins from Pinaceae and Cupressaceae families.....	66
3.2.2. Essential oils from Pinaceae and Cupressaceae families	69
3.3. Uses of conifer resins and essential oils	77
3.3.1. Therapeutic properties of conifer essential oils.....	77
3.3.2. Conifer scent in the perfumer's palette	82
3.3.3. Conifer resin in archeological and art objects.....	83
3.4. Conclusion.....	87
Chapitre 4 Composition chimique de l'huile essentielle et de l'hydrolat des écorces résiduelles de <i>Picea mariana</i>	88
Résumé	89
Abstract.....	90
4.1. Introduction	91
4.2. Experimental.....	92

4.2.1. Materials.....	92
4.2.2. Methods.....	92
4.3. Results and discussion.....	94
4.3.1. Essential oils composition.....	94
4.3.2. Hydrosols composition.....	96
4.4. Conclusions	100
Chapitre 5 Procédé intégré pour la production d'extraits naturels à partir de l'écorce de l'épinette noire.....	101
Résumé	102
Abstract.....	103
5.1. Introduction	104
5.2. Materials and methods.....	106
5.2.1. Plant material and chemicals.....	106
5.2.2. Protocol and process.....	106
5.2.3. Hot water extraction of bark samples.....	108
5.2.4. Total phenol and proanthocyanidin contents of bark extracts.....	109
5.2.5. DPPH assay for antioxidant capacity of the extracts	109
5.2.6. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay	110
5.2.7. Determination of <i>trans</i> -resveratrol concentration in black spruce bark extracts by UPLC-MS/MS.....	110
5.2.8. Higher heating value of bark after extraction.....	111
5.2.9. Statistical analysis	111
5.3. Results and discussion.....	112
5.3.1. Hot water extracts from the integrated process.....	112
5.3.2. Higher heating value of the residual bark	114
5.3.3. Relevance of the integrated process as a biorefinery concept.....	116
5.4. Conclusion.....	117
Chapitre 6 Optimisation de l'extraction des polyphénols bioactifs de l'écorce de <i>Picea mariana</i>	119
Résumé	120
Abstract.....	121
6.1. Introduction	122
6.2. Materials and methods.....	123

6.2.1. Plant material.....	123
6.2.2. Factorial design for multiple extraction experiment	123
6.2.3. Extraction procedure for optimization experiment	124
6.2.4. Isolation and characterization of the hot water extract constituents	124
6.2.5. Phytochemicals assessments of the extracts.....	125
6.2.6. HPLC-DAD analysis.....	126
6.2.7. Chemometric analysis	126
6.2.8. HRMS and NMR analysis.....	127
6.2.9. Statistical analysis	127
6.3. Results and discussion.....	128
6.3.1. Effects of extraction parameters on multiple response factors	128
6.3.2. HPLC fingerprint and chemometric analysis of black spruce bark extract low molecular weight phenolic compounds.....	131
6.3.3. Isolation, identification and quantification of low molecular weight phenolic constituents of black spruce bark extract	134
6.4. Conclusion.....	141
Chapitre 7 Conclusions et perspectives	143
7.1. Conclusions	143
7.2. Perspectives	146
Bibliographie	148
Annexes	167

Liste des figures

Figure 1.1. Voies de biosynthèse des terpènes dans la cellule, adapté de Legendre (2012). .6	6
Figure 1.2. Schéma général de la biosynthèse des terpénoïdes (adapté de Bohlmann & Keeling, 2008). DMAPP: dimethylallyl diphosphate, IPP: isopentenyl diphosphate, GDP: géranyl diphosphate, FDP: farnesyl diphosphate, GGDP: géranyl géranyl diphosphate. 7	7
Figure 1.3. Exemples de monoterpénoïdes..... 8	8
Figure 1.4. Exemples de molécules « signal » émises par les conifères, transformées en phéromones par les prédateurs (Teranishi et al., 1993). 9	9
Figure 1.5. Exemples de sesquiterpénoïdes et de leurs squelettes..... 10	10
Figure 1.6. Paclitaxel et son précurseur diterpénique..... 11	11
Figure 1.7. Acides résiniques majoritaires chez les conifères..... 12	12
Figure 1.8. Structures des triterpénoïdes et exemples de molécules. 13	13
Figure 1.9. Représentant des tétraterpènes 14	14
Figure 1.10. Biosynthèse des polyphénols, adapté de Stevanovic et al., (2009) 15	15
Figure 1.11. Phénols simples..... 16	16
Figure 1.12. Exemple de phénols en C ₆ -C ₁ 17	17
Figure 1.13. Exemple d'acides hydroxycinnamiques..... 17	17
Figure 1.14. Exemples de stilbènes monomères de configuration <i>trans</i> 18	18
Figure 1.15. Exemples de picéasides..... 19	19
Figure 1.16. Exemples de lignanes. 20	20
Figure 1.17. Structure des flavonoïdes. 21	21
Figure 1.18. Structures des flavones et flavonols et exemples de molécules..... 22	22
Figure 1.19. Structure des flavanones et exemple de molécule..... 22	22
Figure 1.20. Structure des flavan-3-ols et exemples. 23	23
Figure 1.21. Structure des anthocyanines et exemples de molécules. 23	23
Figure 1.22. Structure des chalcones et aurones..... 23	23
Figure 1.23. Biosynthèse des gallotanins avec ajout successif d'unités galloyl. 24	24
Figure 1.24. Biosynthèse des proanthocyanidines oligomères et polymères (Stevanovic & Perrin, 2009), R = H, procyanidine, R = OH, prodelphinidine. 25	25
Figure 1.25. Proanthocyanidine dimère avec liaisons de type A (2β-O-7) et B (C4-C8). ... 25	25
Figure 1.26. Schéma d'une installation pour distillation à l'eau et entraînement à la vapeur des huiles essentielles à grande échelle. Le système de refroidissement est le même pour les deux types d'hydrodistillation. 28	28
Figure 2.1. Schéma des étapes de séparation et de purification de l'extrait aqueux brut d'épinette noire..... 54	54

Figure 2.2. Chromatogrammes à 320 nm de l'extrait contrôle HWE-C (a) et des extraits issus du procédé intégré SD-DE (b), SD-HWE (c), WD-DE (d), WD-HWE (e) avec mise en évidence des huit composés identifiés (présentés dans le chapitre 6).	57
Figure 3.1. Abietadiene type resins; A) Abietic acid, B) Dehydroabietic acid, C) Neoabietic acid, D) Levopimaric acid, E) Palustric acid, F) 7-oxo-dehydroabietic acid.	66
Figure 3.2. Pimaradiene type resin acids; F) Pimaric acid, G) Isopimaric acid, H) Sandaracopimaric acid.....	67
Figure 3.3. Example of numbering of the tricyclic diterpene skeleton.	67
Figure 3.4. Labdane type diterpenes from larches and Cupressaceae family resins; I) 13-epimanool, J) Communic acid, K) Larixol; L) Larixol acetate.	68
Figure 3.5. Principal components of turpentine oils; A) α -Pinene, B) β -Pinene, C) Camphene, D) β -Phellandrene, E) (-)-Limonene, F) 3-Carene.	71
Figure 3.6. Oxygenated monoterpenoids found in needle essential oils; A) Borneol, B) Bornyl acetate, C) Camphor, D) Terpinen-4-ol, E) α -Terpineol, F) Thujone.	73
Figure 3.7. Sesquiterpenes in conifer wood oils; A) α -Himachalene, B) β -Himachalene, C) γ -Himachalene, D) (-)-Thujopsene, E) Cedrol, F) Occidentalol.	74
Figure 4.1. Gas chromatogram of the essential oil of black spruce bark; Identification of the major peaks: 1: α -pinene; 2: β -pinene; 3: 3-carene; 4: limonene; and 5: β -phellandrene	95
Figure 4.2. Gas chromatogram of the hydrosol of black spruce bark; Identification of the major peaks: 6: trans-pinocarveol; 7: borneol; 8: terpinen-4-ol; 9: α -terpineol; and 10: verbenone.....	97
Figure 5.1. Steam distillation process scheme. 1: still, 2: bark, 3: steam entrance, 4: recondensed water, 5: draining exit, 6: drained extract, 7: steam with volatile molecules, 8: condenser, 9: cooling water entry, 10: cooling water exit, 11: recondensed water exit, 12: essential oil, 13: hydrosol.	107
Figure 5.2. Diagram of experiment protocol. Names in italic refer to extract names.	108
Figure 6.1. Superposed chromatogram profiles of some of the 36 extracts.	132
Figure 6.2. Principal component analysis of the 36 extracts of black spruce bark; (A) Correlation circle which displays the 8 targeted molecules correlations on the two principal components (axes); (B) Score plot of the 36 extracts (A1 to R2) in function of the two principal components.....	133
Figure 6.3. Structures of the molecules isolated from black spruce hot water extract.	135

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Rendements moyens d'huiles essentielles de conifères.	26
Tableau 2.1. Distribution des différents niveaux des trois paramètres du plan factoriel.	44
Tableau 2.2. Composés organiques volatils (COV) du résinoïde d'écorce d'épinette noire. 49	
Tableau 2.3. Les huit molécules identifiées dans l'extrait aqueux d'écorce d'épinette noire quantifiées dans les extraits issus du procédé intégré. Les quantités sont exprimées en g/100 g d'extrait sec.	58
Table 4.1. Compositions of essential oils from steam distillation and water distillation	98
Table 4.2. Compositions of hydrosols from steam distillation and water distillation	99
Table 5.1. Extraction yield, total phenolic content, proanthocyanidin (PAs) content, and trans-resveratrol content in black spruce bark extracts from integrated process and hot water extract control.	113
Table 5.2. Antioxidant capacity by DPPH and ORAC assays of black spruce bark extracts from integrated process, hot water extract control and positive reference Oligopin®	114
Table 5.3. Higher heating value of processed and non-processed black spruce bark. Results expressed by means and standard deviations in parenthesis.	115
Table 5.4. Qualitative comparisons of the HHV of different black spruce bark samples obtained with SAS software.	115
Table 6.1. Factorial design for the optimization of black spruce bark extraction.	128
Table 6.2. Identification and quantification data for the eight phenolic compounds isolated from black spruce bark extract.	136
Table 6.3. NMR shifts of isolated molecule 6 from black spruce bark hot water extract 1H and 13C shifts and HMBC correlations of 6a and 6b molecules.....	139

Liste des abréviations

AAPH : 2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride

ANOVA : Analyse de la variance

ARGF : Arabinose-Rhamnose-Galactose-Fructose

AWA : Acetone/Water/Acetic acid (acétone/eau/acide acétique)

BHA : Hydroxyanisole butylé

BHT : Hydroxytoluène butylé

CCE : Cyanidin Chloride Equivalent (chlorure de cyanidine équivalent)

COSY : Correlation Spectroscopy

COV : Composés Organiques Volatils

DAD : Diode Array Detector

DMAPP : Diméthylallyl diphosphate

DPPH : Radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

ESI : ElectroSpray Ionization (ionisation par électronébuliseur)

FDP : Farnesyl diphosphate

FID : Flame Ionization Dectector (détecteur à ionisation de flamme)

G3P : Glycéraldéhyde-3-phosphate

GAE : Gallic Acid Equivalent (acide gallique équivalent)

GC : Gas Chromatography (chromatographie en phase gazeuse)

GDP : Géranyl diphosphate

GGDP : Géranyl géranyl diphosphate

HAT : Hydrogen Atom Transfer

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie en phase liquide de haute performance)

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

HSS : Hight Strength Silica

HWE : Hot Water Extract (Extrait à l'eau chaude)

IPP : Isopentenyl diphosphate

LC : Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide)
LSD : Least Significant Difference (plus petite différence significative)
MEP/DXP : Méthyl-érythritol phosphate/désoxyxylulose phosphate
MRM : Multiple Reactions Monitoring
MS : Mass Spectrometry (spectrométrie de masse)
MVA : Mévalonate
ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity (capacité d'absorption des radicaux oxygénés)
PCA : Principal Component Analysis (analyse en composantes principales)
PCS : Pouvoir Calorifique Supérieur
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY : Rotating frame nuclear overhauser effect spectroscopy
SD : Steam Distillation (entraînement à la vapeur)
SD-DE : Steam Distillation-Drained Extract (extrait vidangé entraîné à la vapeur)
SD-HWE : Steam Distillation-Hot water Extract (extrait à l'eau chaude après entraînement à la vapeur)
SEPM : Sapin Épinette Pin Mélèze
SET : Single Electron Transfert
TCD : Thermal Conductivity Detector
TE : Trolox Equivalent
TMA : Tonne Métrique Anhydre
TOF : Time-of-Flight
TPC : Total phenolic content (taux de phénols totaux)
TQD : Tandem Quadrupole Detector
UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography
UV : Ultraviolet
WD : Water Distillation (distillation à l'eau)
WD-DE : Water Distillation-Drained Extract (extrait vidangé distillé à l'eau)
WD-HWE : Water Distillation-Hot Water Extract (extrait à l'eau chaude après distillation à l'eau)

À Paul et Élisabeth Francezon.

Ad augusta per angusta.

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier ma directrice de thèse, la professeure Tatjana Stevanovic pour sa confiance et son soutien pendant ces trois années. Malgré toutes les difficultés que nous avons rencontrées, nous y sommes arrivées, nous avons finalisé ce projet! Merci de m'avoir fait découvrir la chimie du bois, cela a agrandi mes horizons dans ma passion des substances naturelles.

La perte du financement suite au retrait d'un partenaire industriel au début du doctorat a été une expérience particulièrement éprouvante; mon doctorat semblait compromis. Mais c'était sans compter sur l'énergie et la volonté de Stéphane Roche, Sauphie Senneville et Nathalie Carisey de la Faculté de Foresterie, de Géographie et de Géomatique et d'Alain Cloutier et Guylaine Bélanger du Centre de Recherche sur les Matériaux Renouvelables, qui ont débloqué des fonds spéciaux et m'ont exonéré de certains frais d'équipements. Ces efforts, conjugués à un financement de ma directrice ont permis de mener à bien mon projet de doctorat. Merci pour votre efficacité, votre confiance et votre bienveillance.

Un grand merci aux techniciens des ateliers et laboratoires du Centre de Recherche sur les Matériaux Renouvelables pour leur aide et leur bonne humeur. J'adresse une mention spéciale à Yves Bédard, notre technicien des laboratoires de chimie du bois, pour le partage de ses compétences, sa disponibilité et sa patience!

Je remercie également l'INAF pour m'avoir donné l'accès à leurs équipements et l'entreprise Boisaco pour m'avoir fourni gracieusement de la matière première. Je remercie vivement M. Pierre Audet, de la Faculté de Chimie pour son expertise en chimie analytique et son enthousiasme pour mes molécules compliquées!

Je souhaite exprimer des remerciements tout particuliers à mes deux complices au laboratoire, Romaric Naamwin-So-Bâwfu Meda et Thidaud Geoffroy. Pendant trois ans, nous avons travaillé ensemble, nous avons peiné ensemble mais surtout nous avons énormément ri! Merci pour ces moments scientifiques et festifs!

À mes amis de Québec et de France pour leur bonne humeur et leur affection.

À mes parents, pour leur amour inconditionnel et leur confiance sans faille.

Avant-propos

Ce projet de doctorat était initialement financé par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) dans le cadre d'un projet initié avec deux entreprises partenaires, Nuvac Ecoscience Inc et Boisaco Inc. Suite à la perte de ce financement, les efforts conjugués de la Faculté de Foresterie, Géographie et Géomatique, du Centre de Recherche sur les Matériaux Renouvelables (CRMR) et de ma directrice Tatjana Stevanovic ont permis de trouver les fonds nécessaires à l'aboutissement de ce doctorat.

Les travaux de recherche ont principalement été effectués dans les laboratoires de chimie du bois du Centre de Recherche sur les Matériaux Renouvelables (CRMR), mais aussi à l'Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF) et au département de chimie de la Faculté des Sciences et Génie de l'Université Laval. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de trois articles scientifiques.

Cette thèse « par article » est composée de six chapitres. Le premier est une revue de littérature, faisant un état de l'art sur les écorces, la chimie des substances naturelles et les procédés d'extraction, entre autres. Le second décrit la démarche scientifique adoptée et détaille les expériences effectuées. Le troisième présente un chapitre de livre sur les huiles essentielles et résines de conifères « Conifer Resins and Essential Oils: Chemical Composition and Applications » pour le livre en préparation « *Chemistry of lignocellulosics : current trends* ». Les chapitres 4, 5 et 6 sont constitués des trois articles scientifiques ci-dessous :

Article 1

Francezon, N., Stevanovic, T. (2017). Chemical composition of essential oil and hydrosol from *Picea mariana* bark residue. Publié dans *BioResources*, 12(2), 2635-2645, le 21 février 2017.

Article 2

Francezon, N., Stevanovic, T. (2017). Integrated process for the production of natural extracts from black spruce bark. Publié dans *Industrial Crops and Products*, 108, 348-354, le 1^{er} décembre 2017 et disponible en ligne dès le 10 juillet 2017.

Article 3

Francezon, N., Romaric Meda, N.R., Stevanovic T. (2017). Optimization of bioactive polyphenols extraction from *Picea mariana* bark. Publié dans *Molecules*, 22(12), 2118, le 1^{er} décembre 2017.

Nellie Francezon, étudiante au doctorat est l'auteure de cette thèse. Elle est également l'auteure principale des articles scientifiques et du chapitre de livre. Les travaux de planification, de réalisation expérimentale, d'interprétation des résultats et de rédaction des articles ont été effectués par l'étudiante sous la direction de la directrice de thèse. Les co-auteurs des articles scientifiques ont contribué à l'interprétation des résultats, à leur mise en forme, et ont apporté les corrections pour leur soumission aux journaux scientifiques. Le chapitre de livre a été co-écrit avec Tatjana Stevanovic, qui a rédigé les parties sur les résines et leurs applications.

Introduction

Chaque année au Québec sont produites plus de 1,5 millions de tonnes métriques anhydres (tma) d'écorces de conifères (Registre Forestier, 2017), résidus de l'industrie de transformation du bois. Ces énormes volumes représentent une charge pour les scieries; les écorces sont, la plupart du temps, brûlées pour générer de l'énergie. D'un point de vue chimique, c'est une véritable perte lorsque l'on sait que beaucoup de molécules d'intérêt thérapeutique ont été découvertes dans des écorces, notamment le paclitaxel, un puissant anti-cancer provenant de l'écorce de l'if *Taxus baccata*, l'acide salicylique, précurseur de l'aspirine, isolé de l'écorce du saule *Salix alba* ou encore l'antipaludéen la quinine extrait de l'écorce de *Cinchona officinalis*.

Un exemple réussi de valorisation chimique de la biomasse forestière est l'extrait naturel d'écorce de pin maritime (*Pinus pinaster*), de nom commercial Pycnogenol® ou Oligopin® à action thérapeutique anti-inflammatoire, antioxydante, antidiabétique, immunostimulante ou encore antiagrégant plaquettaire (Rohdewald, 2010). En plus de leur potentiel pharmacologique, les extraits naturels, de plus en plus prisés par les consommateurs, intéressent fortement les industries agroalimentaires, cosmétiques et nutraceutiques. Leur potentiel antioxydant est d'importance majeure pour ces secteurs qui sont de grands utilisateurs d'antioxydants de synthèse tels que le BHA (E320) ou le BHT (E321), dont la toxicité présumée fait l'objet de mesures restrictives. D'autres extraits naturels, comme les huiles essentielles de conifères sont également produites à partir de biomasse résiduelle; principalement des branches et feuillages issus des coupes.

Endémique du Canada, l'épinette noire est le conifère le plus abondant des forêts boréales canadiennes. Les pessières noires, principalement localisées au Québec, représentent 28 % du territoire québécois (Gagnon, 2001). Essence d'intérêt économique pour le Québec, l'épinette noire est abondamment exploitée par l'industrie forestière pour la qualité de son bois de charpente. Elle représente, avec l'épinette blanche, 59 % du volume de bois rond (m³) entrant dans les scieries SEPM (Sapin Épinette Pin Mélèze). En conséquence, d'importantes quantités d'écorces résiduelles sont générées, soit environ 920 000 tma chaque année pour les épinettes (Registre Forestier, 2017). Bien connu des peuples des Premières Nations pour leurs propriétés thérapeutiques (McCune, 2012), les écorces d'épinette noire sont riches en

polyphénols antioxydants et en résine terpénique et pourraient potentiellement constituer de nouveaux ingrédients actifs et extraits naturels.

Face aux problèmes économiques rencontrés par l'industrie forestière, le concept de développement durable permet de dégager de nouvelles alternatives écoresponsables dans la filière du bois par la valorisation de la biomasse forestière. L'extraction systématique des molécules bioactives des écorces des essences canadiennes permettrait de créer de nouveaux produits à haute valeur ajoutée pour l'industrie forestière en recherche de solutions innovantes.

L'objectif général de ce projet de doctorat est de développer de nouveaux produits naturels riches en composés d'intérêt à partir de l'écorce de l'épinette noire, tout en proposant des procédés innovants et optimisés.

Chapitre 1 Revue de littérature

1.1. Les écorces

L'écorce est la première ligne de défense de l'arbre contre la dessiccation, les blessures mécaniques, les agressions pathogènes et les attaques de prédateurs. Elle protège le cambium, le tissu méristématique secondaire permettant la croissance de la tige en diamètre. Le cambium produit du bois à l'intérieur et de l'écorce interne à l'extérieur. L'écorce interne, aussi appelée phloème, a pour rôle de conduire la sève élaborée des méristèmes apicaux vers les tissus basaux. Une deuxième couche de cellules méristématiques, le phellogène, permet la synthèse de l'écorce externe, composée du phelloderme, du phellogène et du suber (Vaucher, 1993). L'écorce constitue 8% de la masse sèche d'un arbre (Desrochers, 2011). Elle est composée de trois éléments structuraux polymères, la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. La cellulose est un polymère fibreux de glucose, conférant une résistance mécanique aux parois cellulaires. Elle est étroitement liée aux hémicelluloses, des polymères de différents monosaccharides. Ces deux polymères polysaccharides représentent entre 30 et 48% de la masse anhydre de l'écorce des résineux (Harkin & Rowe, 1971). La lignine, composant 40 à 55% de l'écorce sèche, est un polymère tridimensionnel de molécules phénoliques permettant de « coller » les cellules entre elles. En plus de ces constituants principaux, l'écorce contient une quantité variable de molécules de faibles poids moléculaires, les extractibles. Ils peuvent atteindre 25% de la masse anhydre de l'écorce chez les résineux contre seulement 2 à 9% pour le bois (Harkin & Rowe, 1971).

1.2. Les extractibles forestiers

Les extractibles sont, par définition, des composés que l'on peut extraire facilement de la matrice végétale, grâce à des procédés non agressifs. Ce sont des molécules libres qui ne sont pas liées de manière covalente aux éléments structuraux du bois. De simples solvants organiques ou aqueux peuvent extraire ces molécules alors que d'autres éléments du bois comme la cellulose ou la lignine nécessitent des traitements chimiques forts (acides, fortes températures). Les extractibles sont des métabolites secondaires, synthétisés par la plante pour des fonctions non essentielles (non impliquées dans la nutrition ou la croissance) telles

que la défense contre les pathogènes, la communication entre les individus ou encore l'attraction des pollinisateurs. Ce sont donc des molécules bioactives, présentant une large gamme de propriétés : antifongique, antibactérienne, antioxydante, répulsive, astringente... (Bruneton, 1999). Plus spécifiquement dans le bois, les extractibles sont responsables de sa couleur, de son odeur, de sa durabilité ou encore de ses propriétés mécaniques et physiques (Stevanovic & Perrin, 2009).

Les extractibles sont stockés dans le lumen des cellules, et ce, dans toutes les parties de l'arbre, des racines jusqu'aux feuilles. Certains d'entre eux sont exsudés sous forme de résine par le biais de structures spécialisées, les canaux résinifères. Les taux en extractibles varient selon les tissus, selon les saisons, les individus, l'âge... etc. Cependant, avec 5 à 25% de teneur en extractibles (Harkin & Rowe, 1971), les écorces représentent l'un des tissus les plus intéressants à étudier pour son abondance et sa diversité en métabolites secondaires.

Différentes familles de molécules composent les extractibles forestiers dont les principales sont les terpénoïdes, les polyphénols, les glucides complexes, les composés azotés (protéines et alcaloïdes), les cires, les graisses, et autres acides gras. Les terpénoïdes et les polyphénols sont présentés plus en détails en raison de leurs multiples applications dans les domaines pharmaceutique, cosmétique, nutraceutique et agroalimentaire (Stevanovic & Perrin, 2009).

1.3. Les terpénoïdes

Dans cette section sont détaillés la classification des terpénoïdes, leur voie de biosynthèse ainsi qu'un aperçu de leur utilisation. Le chapitre 3 présente un chapitre du livre « Chemistry of lignocellulosics : current trends » sur les huiles essentielles et les résines de conifères. Il développe plus longuement la chimie des terpenoïdes des huiles essentielles et des résines de conifères des familles Pinaceae et Cupressaceae des zones tempérées, ainsi que leurs applications.

1.3.1. L'oléorésine, la source des terpénoïdes

Les conifères sont la source la plus abondante de composés terpéniques dans la nature (Stevanovic & Perrin, 2009). Chez les conifères, les composés volatils sont contenus dans l'oléorésine. Celle-ci est un mélange de monoterpénoïdes et de sesquiterpénoïdes volatils (térébenthine), et de diterpénoïdes non volatils, les acides résiniques (Teranishi et al., 1993; Zulak & Bohlmann, 2010).

Les terpénoïdes constituant l'oléorésine sont produits dans des cellules achlorophylliennes à partir de la sève élaborée riche en composés issus de la photosynthèse (Fernandez & Chémat, 2012). Chez les conifères, il s'agit des cellules épithéliales tapissant l'intérieur des canaux résinifères. Elles peuvent être à parois épaisses comme chez les épinettes (*Picea* spp.) ou à parois minces comme chez les pins (*Pinus* spp.). La résine est ensuite excrétée dans le milieu extracellulaire, à savoir le lumen des canaux résinifères (Fernandez & Chémat, 2012). Les canaux résinifères sont très communs chez les genres *Pinus* et *Picea* et constituent un réseau complexe (Teranishi et al., 1993). Ils sont présents dans le bois, dans l'écorce et également dans les aiguilles. Les canaux les plus larges se retrouvent chez les pins que l'on exploitait pour la récolte de la résine, « le gemmage », pour produire la térébenthine (Stevanovic & Perrin, 2009). L'accumulation de la résine dans les canaux résinifères est un processus physiologique normal mais elle peut aussi être stimulée par un traumatisme (blessure, infection). Un traumatisme induit le développement de canaux résinifères traumatiques et conduit à une production de résine sur demande. Cette résine est appelée résine secondaire; sa composition chimique peut varier de celle de la résine constitutive, notamment en monoterpènes (Teranishi et al., 1993). Ainsi, cela implique l'existence de deux mécanismes de défense différents. Les espèces possédant de la résine constitutive (*Pinus* spp., *Picea* spp., *Larix* spp.) en grande quantité dans leur système résinifère bien développé ne font que transloquer la résine vers le site d'infection, alors que les espèces n'ayant que peu de résine constitutive (capacité biosynthétique limitée et/ou stockage limité) doivent augmenter drastiquement leur production en terpènes sur un site localisé dans les quelques jours suivant la blessure (Teranishi et al., 1993).

1.3.2. Voie de biosynthèse

Tous les terpènes dérivent de deux précurseurs: l'isopentenyl diphosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl diphosphate (DMAPP), selon deux voies de biosynthèse, la voie du mévalonate (MVA) dans le cytoplasme et la voie du méthyl-érythritol phosphate/désoxyxylulose phosphate (MEP/DXP) dans le plaste (Figure 1.1). L'interconversion entre ces deux isomères représente une étape essentielle à la synthèse des différentes classes de terpènes. Elle est réalisée par un mécanisme de protonation-déprotonation par l'enzyme IPP isomérase (Legendre, 2012). La voie du MVA utilise l'acétyl CoA issu de la photosynthèse pour produire les sesquiterpènes et les triterpènes (Figure 1.1). La voie MEP/DXP utilise le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et le pyruvate provenant également de la photosynthèse pour produire les monoterpènes, les diterpènes et les tétraterpènes (Figure 1.1).

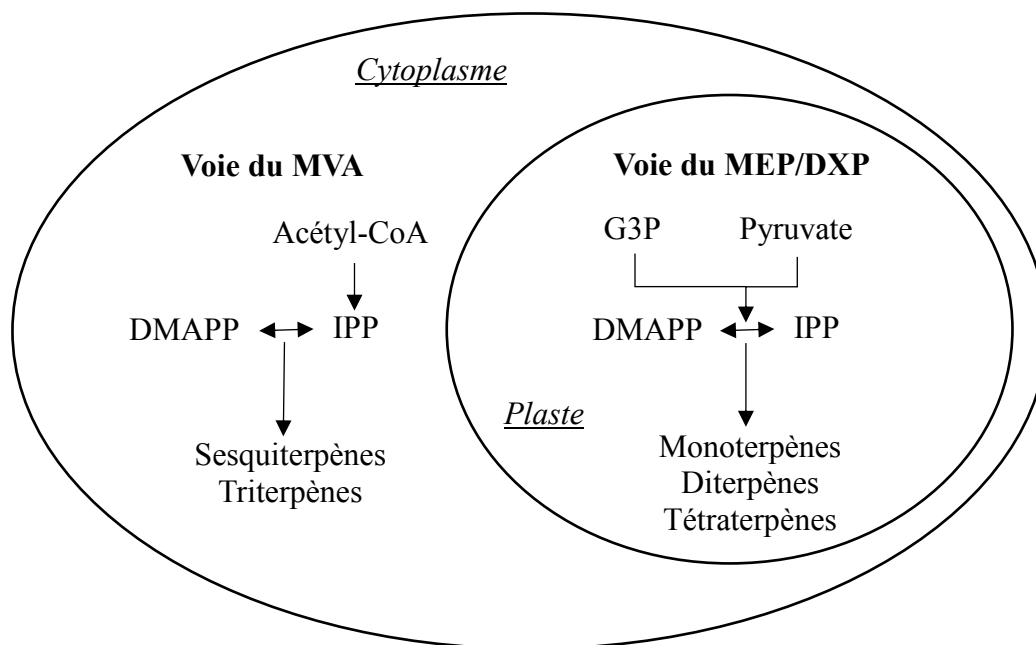


Figure 1.1. Voies de biosynthèse des terpènes dans la cellule, adapté de Legendre (2012).

L'assemblage successif d'un DMAPP et de plusieurs IPP permet la création des différentes classes de terpènes (Figure 1.2). Chaque groupe de terpènes possède donc un précurseur unique, qui, au terme de multiples cyclisations, réarrangements et fonctionnalisations, crée

toute une gamme de molécules. Ainsi, un DMAPP couplé à un IPP donne du géranyl diphosphate, précurseur de la grande famille des monoterpènes en C₁₀. Un DMAPP et deux IPP forment le farnesyl diphosphate qui constitue ensuite les sesquiterpènes en C₁₅ et les triterpènes en C₃₀. Enfin, de la condensation d'un DMAPP et de trois IPP résulte le géranyl géranyl diphosphate dont découlent les diterpènes en C₂₀ et les tétraterpènes en C₄₀.

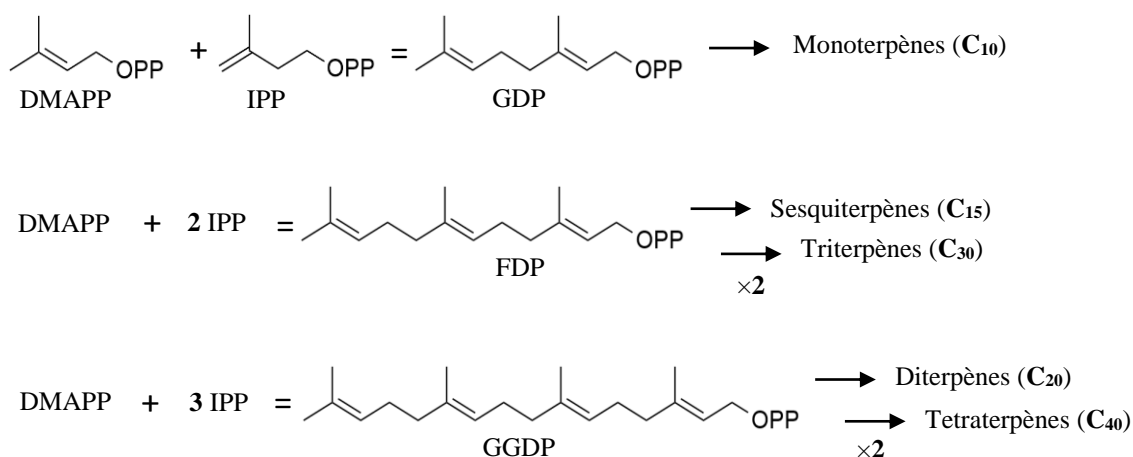


Figure 1.2. Schéma général de la biosynthèse des terpénoïdes (adapté de Bohlmann & Keeling, 2008). DMAPP: diméthylallyl diphosphate, IPP: isopentényl diphosphate, GDP: géranyl diphosphate, FDP: farnesyl diphosphate, GGDP: géranyl géranyl diphosphate.

1.3.3. Les monoterpénoïdes

Les monoterpénoïdes sont des hydrocarbures à 10 carbones qui dérivent tous d'un précurseur unique, le géranyl diphosphate (GDP). Ils subissent des réarrangements, des cyclisations (jusqu'à trois cycles comme c'est le cas du tricyclène) et des fonctionnalisations (ajout de groupements oxygénés principalement) par action enzymatique (Figure 1.3).

Les monoterpénoïdes sont des composés de faibles poids moléculaires (136 Da pour les hydrocarbures et jusqu'à 200 Da pour les dérivés oxygénés). Très volatils, ils sont aussi des principes odorants, naturellement émis par les plantes pour des fonctions d'attraction de pollinisateurs ou de répulsions de prédateurs. Capturés par des procédés comme l'hydrodistillation, ils forment des extraits appelés huiles essentielles. Parmi les conifères, la fraction enrichie en monoterpènes la plus connue et la plus utilisée est la térébenthine. Il s'agit de la partie volatile issue de la distillation à la vapeur de la résine des pins. Elle est

principalement constituée de monoterpènes hydrocarbures, dont les plus abondants sont l' α - et le β -pinène (Figure 1.3). Les monoterpènes hydrocarbures sont, d'ailleurs, les constituants les plus courants des résines alors que les dérivés oxygénés sont plus abondants dans les huiles essentielles de feuilles ou de fleurs (Stevanovic & Perrin, 2009).

En plus de leur pouvoir parfumant, ces molécules possèdent respectivement des propriétés médicinales, qui en synergie, font la réputation des huiles essentielles en aromathérapie.

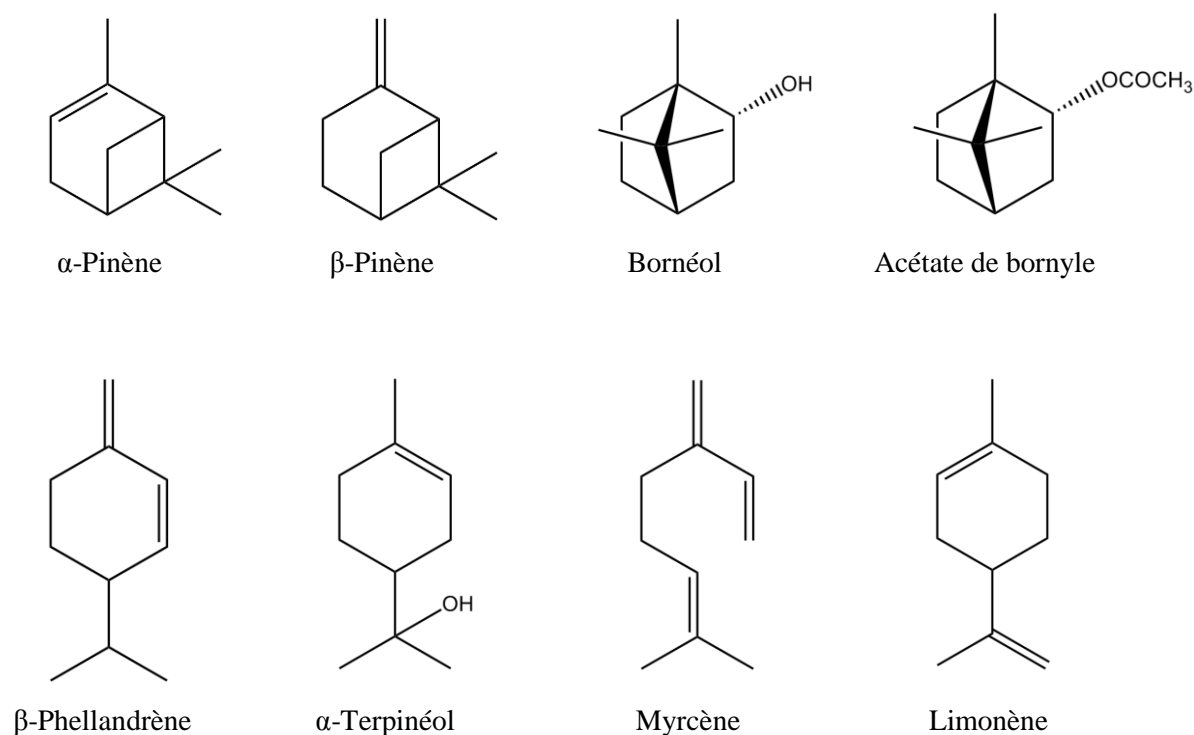


Figure 1.3. Exemples de monoterpénoïdes.

Les terpénoïdes volatils sembleraient être également impliqués dans la protection de la plante contre la chaleur et le stress oxydatif (Owen & Penuelas, 2005). Le rôle de molécule de communication aurait une fonction d'attraction des insectes pollinisateurs, aidant ainsi à la fonction de reproduction, mais aussi, de molécules « signal » pour préserver les arbres environnants en cas d'attaque (Keeling & Bohlmann, 2006). Cependant, l'émission de ces terpènes signaux dans l'air peut leur être délétère. Les insectes prédateurs les utilisent entre autre pour reconnaître leurs hôtes des non-hôtes et les hôtes plus faibles, afin de maximiser l'efficacité de leurs attaques. Ils arrivent également à détoxifier ces terpènes et à les

transformer en phéromones pour attirer leurs congénères et orchestrer une attaque massive (Keeling & Bohlmann, 2006). Par exemple, des terpènes produits en abondance par les conifères tels que les pinènes sont transformés en verbénone par des insectes du genre *Ips* spp. (Figure 1.4). Il en va de même pour le myrcène transformé en ipsdienol et ipsenol, première molécule ayant permis d'identifier ce mécanisme de contre-attaque par les insectes (Teranishi et al., 1993).

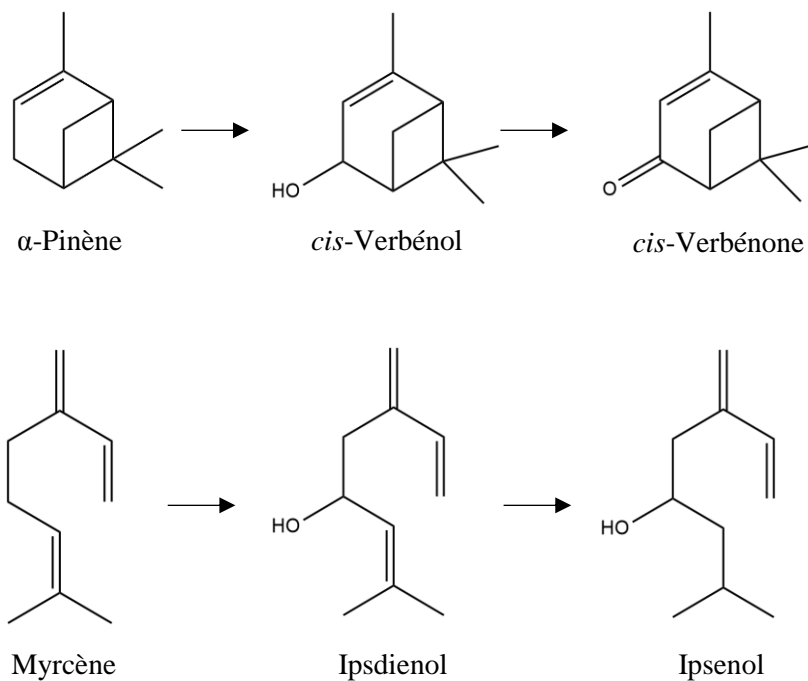


Figure 1.4. Exemples de molécules « signal » émises par les conifères, transformées en phéromones par les prédateurs (Teranishi et al., 1993).

1.3.4. Les sesquiterpénoïdes

Groupe de terpénoïdes le plus vaste (avec plus de 2500 composés identifiés), les sesquiterpénoïdes sont des composés à 15 carbones dérivant du farnésyl diphosphate (Figure 1.5). Ce dernier étant plus long que le géranyl diphosphate, ses multiples cyclisations possibles ont donné naissance à plus d'une centaine de squelettes structuraux différents. Parmi les huiles essentielles de conifères, celles distillées à partir des bois de cèdres sont particulièrement riches en sesquiterpènes. Par exemple, le squelette himachalane est retrouvé chez les isomères α -, β - et γ -himachalène (Figure 1.5), composants majoritaires des huiles essentielles de bois de cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*) et cèdre de l'Himalaya (*Cedrus deodara*) (Guenther, 1952). Il en est de même pour le squelette cédrane qui est à la base du cédrène et de son dérivé oxygéné le cédrone (Figure 1.5). Ces derniers sont très largement représentés dans les huiles essentielles de cèdre de Virginie (*Juniperus virginiana*) et cèdre du Texas (*Juniperus mexicana*) (Guenther 1952).

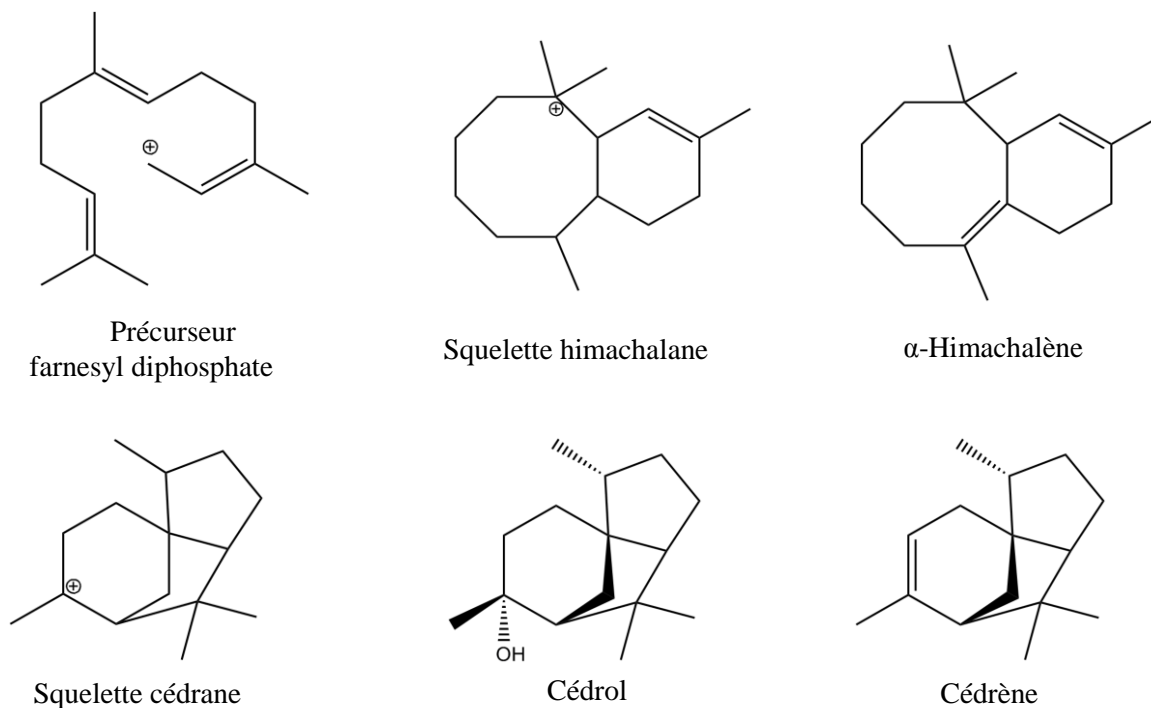


Figure 1.5. Exemples de sesquiterpénoïdes et de leurs squelettes.

Les sesquiterpénoïdes sont aussi des composés volatils (autour de 200-220 Da) et se retrouvent dans les huiles essentielles aux côtés des monoterpénoïdes comme constituants et principes odorants. Leur contribution au parfum d'une huile essentielle se caractérise par leur

ténacité, formant les notes de fond d'une fragrance. Ils agissent aussi en tant que fixateur pour les odeurs plus légères des monoterpénoïdes (Sell, 2010). Certains sesquiterpènes possèdent des rôles essentiels pour la plante comme attracteurs de pollinisateurs et phytoalexines (Crozier et al., 2008). Le juvabione, par exemple, est un inhibiteur de l'activité de l'hormone juvénile des coléoptères, empêchant leur développement et leur reproduction. Cette molécule, un sesquiterpène structurellement lié au bisabolène, est présente dans le bois de cœur du sapin baumier (*Abies balsamea*) (Keeling & Bohlmann, 2006; Stevanovic & Perrin, 2009).

1.3.5. Les diterpénoïdes

Les diterpénoïdes sont formés par de multiples cyclisations du précurseur géranyl-géranyl diphosphate (GGDP), dont résulte la formation de différents squelettes diterpéniques de base. Par exemple, le squelette taxadiène est impliqué dans la formation du paclitaxel issu de l'if *Taxus baccata* (Figure 1.6); le modèle levopimaradiène permet la synthèse des ginkgolides provenant de *Ginkgo biloba* (Crozier et al., 2008), et les structures pimarane et abietane sont les précurseurs des acides résiniques des conifères (Figure 1.7).

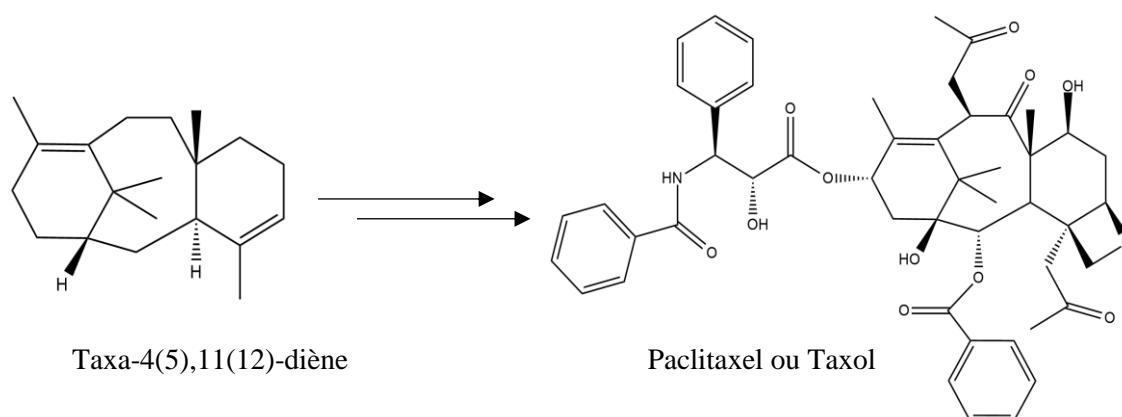


Figure 1.6. Paclitaxel et son précurseur diterpénique.

Chez les conifères, les diterpénoïdes sont les constituants majoritaires de l'oléorésine, constituant le résidu solide après évaporation de la partie volatile (Stevanovic & Perrin, 2009). Ce sont principalement des diterpénoïdes hydrocarbures, alcools et aldéhydes, et les acides résiniques (dérivés carboxyliques des diterpènes). Les acides résiniques sont le plus souvent des composés tricycliques (Figure 1.7). Ils peuvent composer jusqu'à 65% de la résine de *Picea abies*. Un exemple d'acide résinique largement répandu chez les conifères, et notamment dans le genre *Pinus*, est l'acide abiétique et ses dérivés (Stevanovic & Perrin, 2009); (Teranishi et al., 1993) (Figure 1.7).

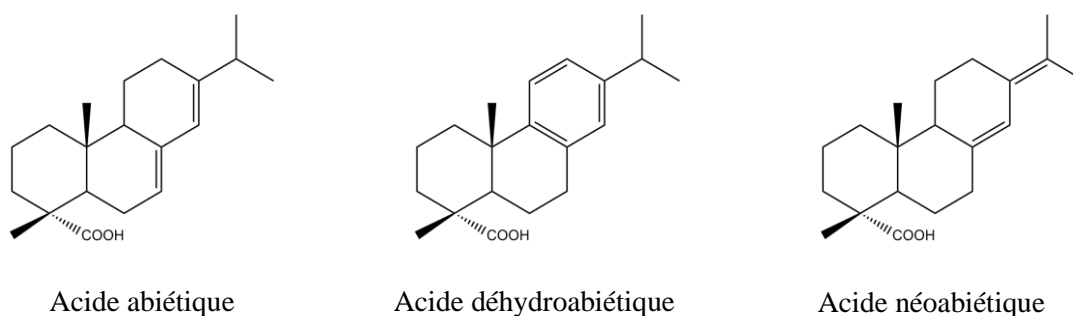


Figure 1.7. Acides résiniques majoritaires chez les conifères.

Les diterpénoïdes de la résine forment une barrière physique contre l'attaque des prédateurs. Les monoterpènes et sesquiterpènes volatils servent de solvant aux acides résiniques. Leur évaporation permet la polymérisation et la cristallisation des diterpènes, formant un « bouchon » solide protecteur (Keeling & Bohlmann, 2006). La viscosité induite par les diterpènes permet d'engluer les parasites et les pousse hors du site d'invasion. La résine désinfecte également la blessure sur son passage et forme une nouvelle barrière solide en polymérisant (Teranishi et al., 1993).

Plusieurs rôles physiologiques essentiels dans la plante sont remplis par des diterpénoïdes. Les gibbérellines (famille de diterpénoïdes tétracycliques) sont des phytohormones; elles interviennent dans la croissance du végétal (Crozier et al., 2008). De nombreux diterpénoïdes possèdent aussi une activité thérapeutique. L'exemple le plus intéressant est sûrement celui du paclitaxel (Figure 1.6), considéré de nos jours comme un des composés anticancéreux les plus efficaces (Crozier et al., 2008).

1.3.6. Les triterpénoïdes et tétraterpénoïdes

Les terpénoïdes de plus haut poids moléculaire comme les triterpénoïdes en C_{30} et les tétraterpénoïdes en C_{40} ne sont pas volatils (il en est de même pour les diterpénoïdes). Ils n'entrent donc pas dans la composition des huiles essentielles. Cependant, il est intéressant de mentionner qu'ils remplissent des fonctions importantes pour la plante et présentent parfois des activités thérapeutiques. Les triterpènes, constituants des extraits lipophiles du bois sont structurellement très semblables, et suivent deux types de squelette : un tétracyclique et un pentacyclique (Figure 1.8). Les triterpénoïdes permettent la production des phytostérols comme le stigmastérol (Figure 1.8) (Stevanovic & Perrin, 2009).

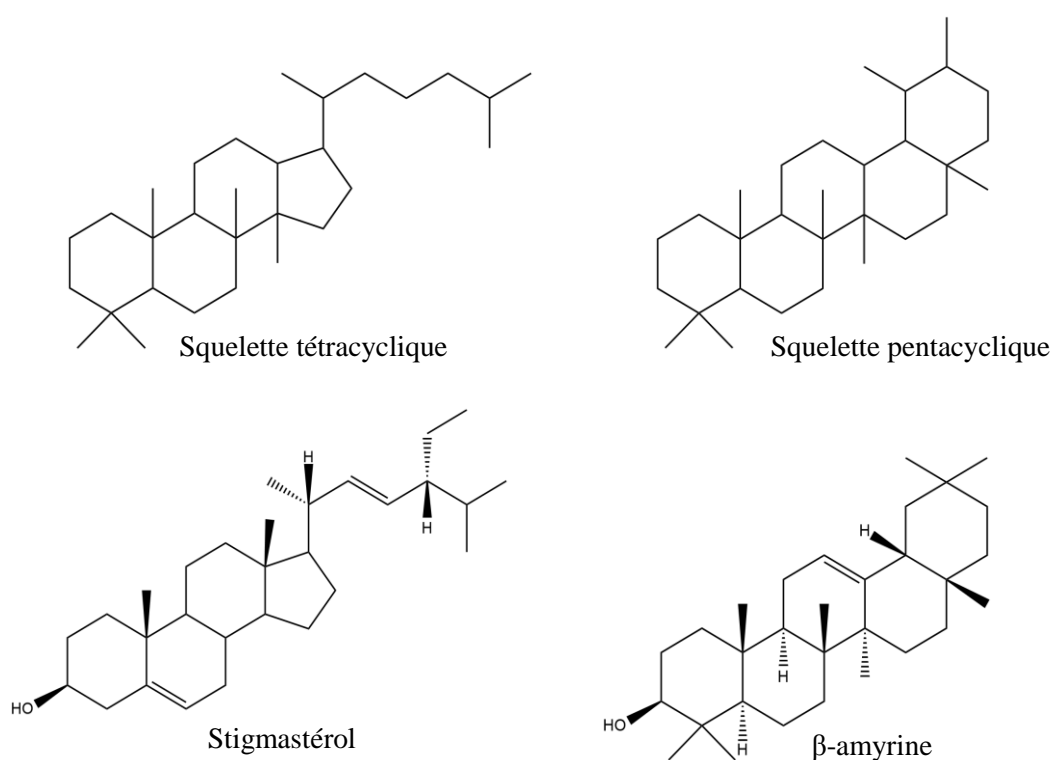


Figure 1.8. Structures des triterpénoïdes et exemples de molécules.

Les caroténoïdes, les pigments rouges et jaunes des plantes, sont les représentants uniques mais non moins importants des tétraterpènes en C_{40} (Figure 1.9). Présents essentiellement dans les tissus photosynthétiques des feuilles, ils sont des constituants des membranes et sont impliqués dans la protection de la fonction de photosynthèse en palliant les dommages thermiques, lumineux et les stress oxydatifs qui en résultent (Owen & Penuelas, 2005).

Enfin, parmi les plus gros terpènes, citons les terpénoïdes supérieurs polymères, constituants du caoutchouc, un polyisoprène.

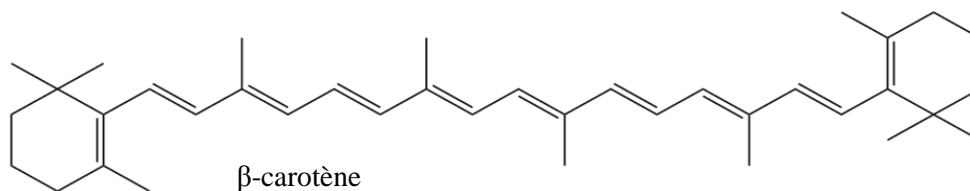


Figure 1.9. Représentant des tétraterpènes

1.4. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques extractibles sont localisés principalement dans le lumen des cellules. Certaines cellules de parenchyme du phloème sont spécialisées dans la synthèse et le stockage des composés phénoliques (Krokene et al., 2008). Très abondantes dans le phloème, ces cellules forment des cernes annuels, et peuvent se développer suite à une attaque de pathogènes.

Les composés phénoliques sont caractérisés par une structure constituée d'un noyau benzénique contenant au moins une fonction hydroxyle. Ce sont des composés plutôt hydrosolubles ou solubles dans des solvants polaires. Les composés phénoliques sont issus de deux voies de biosynthèse : la voie du shikimate et la voie de l'acétate.

1.4.1. Voies de biosynthèse

Chez les végétaux, les composés phénoliques sont produits par deux voies de biosynthèse à partir des sucres issus de la photosynthèse (Figure 1.10). La première est la voie du shikimate qui permet de synthétiser d'une part les tanins hydrolysables via la formation d'acide gallique et d'autre part des acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) qui, après désamination, forment les précurseurs de la voie des phénylpropanoïdes conduisant aux acides cinnamiques et acides hydroxycinnamiques (Bruneton, 1999). Leurs dérivés donnent ensuite les divers acides phénoliques simples, les lignanes mais également les lignines par polymérisation. La deuxième voie, en combinaison avec la voie du shikimate, permet la formation des polyacétates et ainsi des chromones, des xanthones ou encore des quinones et

du précurseur malonyl CoA. La combinaison de ce dernier avec le *p*-coumaroyl CoA issu de la voie des phénylpropanoïdes permet la synthèse de la grande famille des flavonoïdes, des stilbènes et des tanins condensés (Bruneton, 1999).

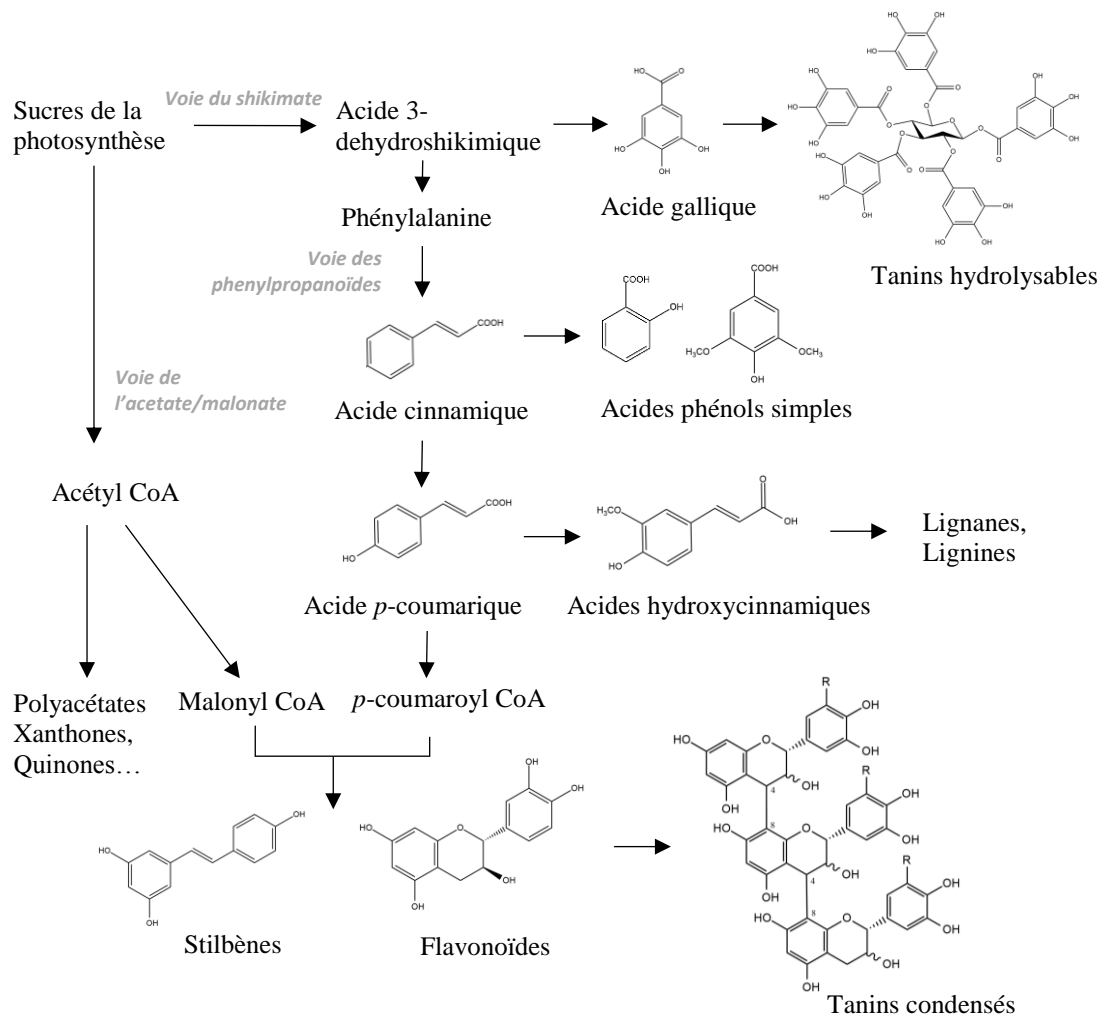


Figure 1.10. Biosynthèse des polyphénols, adapté de Stevanovic et al., (2009)

1.4.2. Les phénols et acides phénols

Issus de la voie des phénylpropanes, ces petits composés phénoliques sont caractérisés par des squelettes simples à noyau aromatique en C₆, et à noyau aromatique greffé d'une chaîne à un ou plusieurs carbones C₆-C₁, C₆-C₂ et C₆-C₃. Les phénols simples, en C₆, (Figure 1.11) sont représentés dans différentes espèces d'arbres. Par exemple, l'alcool salicylique et son glycoside la salicyline, molécules anti-inflammatoires structurellement liées à l'aspirine, ont été découverts chez les saules (*Salix* spp.). Le phloroglucinol, un antispasmodique, a été retrouvé dans les bois de plusieurs espèces, principalement sous sa forme glycoside (Stevanovic & Perrin, 2009). Le thymol et le guaïacol sont des composés phénoliques volatils des huiles essentielles de thym et de bois de Gaïac respectivement.

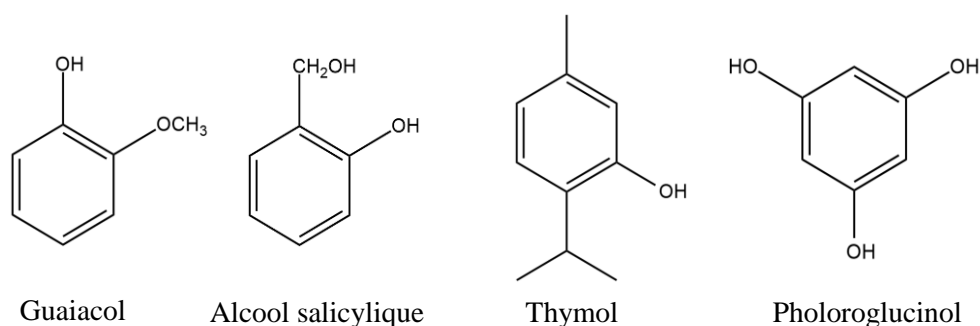


Figure 1.11. Phénols simples.

Parmi les composés en C₆-C₁, sont retrouvés des acides hydroxybenzoïques tels que l'acide salicylique, l'acide vanillique, l'acide syringique et leurs dérivés aldéhydes : la vanilline, l'aldéhyde salicylique et le syringaldéhyde. Les acides gallique et protocatéchuique (Figure 1.12), très communs dans les plantes ligneuses, polymérisent pour donner les tanins hydrolysables (Stevanovic & Perrin, 2009).

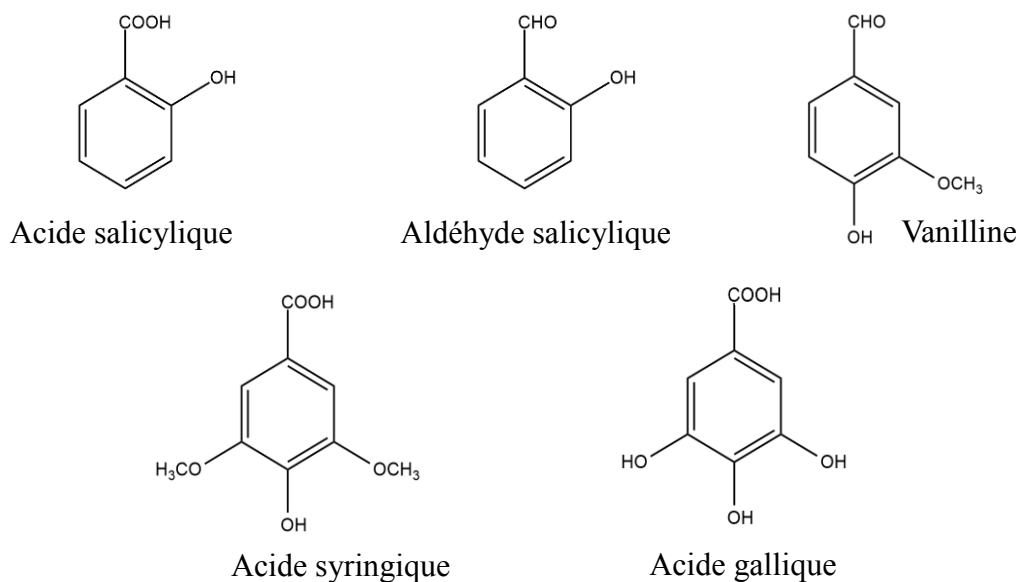


Figure 1.12. Exemple de phénols en C₆-C₁

Les acides hydroxycinnamiques, dérivés du cinnamate sont des structures en C₆-C₃ très répandues chez les arbres puisqu'impliquées dans la biosynthèse de la lignine (Stevanovic & Perrin, 2009), comme les acides *p*-coumarique, férulique (Figure 1.13) et sinapique. Ils sont présents dans la matrice végétale sous forme libre, glycosylée, estérifiée ou encore liée à la paroi cellulaire (Carnachan & Harris, 2000).

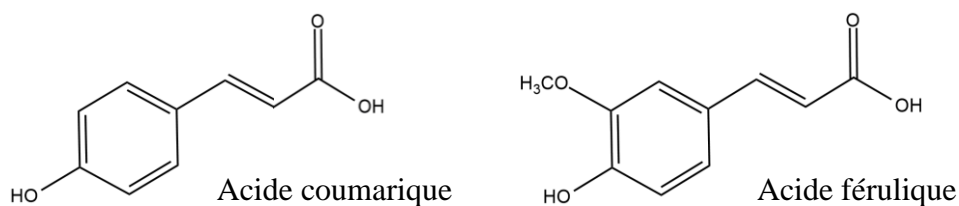


Figure 1.13. Exemple d'acides hydroxycinnamiques

1.4.3. Les stilbènes

Issus des voies de biosynthèse de l'acétate et des phénylpropanes, les stilbènes possèdent un squelette à deux noyaux aromatiques en C₆-C₂-C₆. Cette famille de polyphénols se compose de dérivés hydroxylés et méthoxylés du stilbène simple (Figure 1.14), ainsi que leurs dérivés glycosylés et oligomères. Synthétisés par l'enzyme stilbène synthase induite en cas

d'agression ou de stress, les stilbènes sont des phytoalexines (Jeandet et al., 2010; Roupe et al., 2006). L'expression de cet enzyme étant non-ubiquitaire, seules quelques familles botaniques produisent des stilbènes, comme les Vitaceae, les Dipterocarpaceae, les Fabaceae, les Cyperaceae, les Gnetaceae et les Pinaceae (Rivière et al., 2012). Très représentés chez les conifères, les stilbènes ont des propriétés antifongiques et antibactériennes (Plumed-Ferrer et al., 2013; Woodward & Pearce, 1988). Par exemple, la pinosylvine est retrouvée dans plusieurs espèces de pins (Lee et al., 2005; Rowe et al., 1969) et l'isorhapontine et son aglycone l'isorhapontigénine chez *Picea* spp. (Solhaug, 1990) (Figure 1.14). Le resvératrol, le picéatannol et leurs glycosides (le picéide et l'astringine) ont également été identifiés dans plusieurs espèces de la famille Pinaceae.

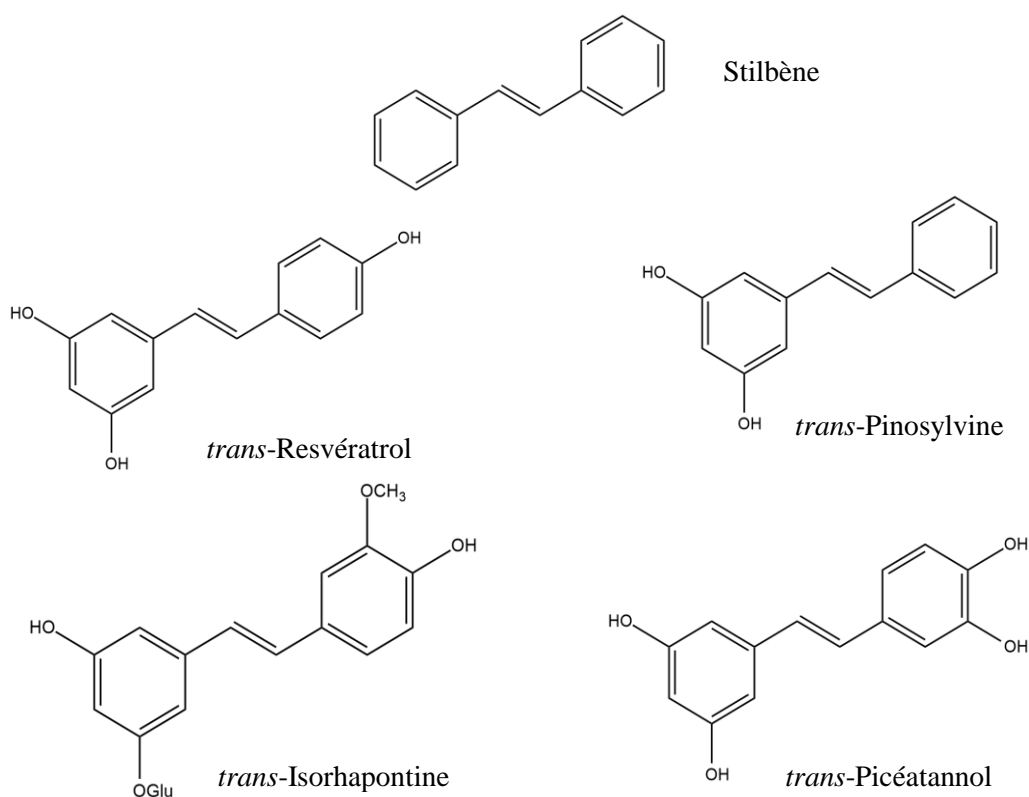


Figure 1.14. Exemples de stilbènes monomères de configuration *trans*

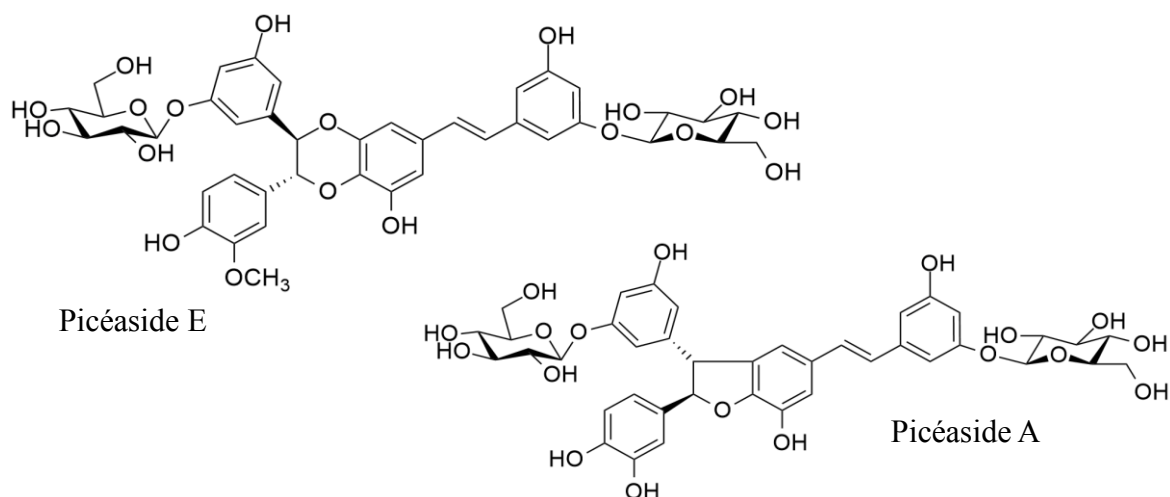
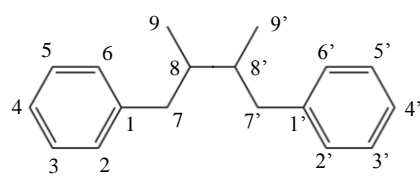


Figure 1.15. Exemples de picéasides.

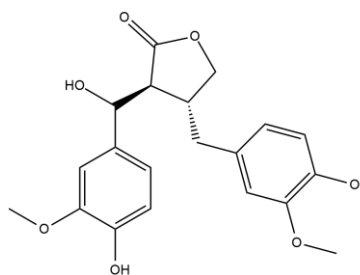
Dans le genre *Picea* ont été identifiés 14 stilbènes oligomères différents, nommés picéasides A à N. Ces composés sont principalement des dimères d'astringine et des dimères d'astringine et isorhapontine (Gabaston et al., 2017; Li et al., 2008). La dimérisation met en jeu la double liaison *trans* d'une molécule et un ou deux groupes hydroxyles d'une autre molécule (Figure 1.15). A la différence des autres oligomères de stilbènes représentés dans d'autres espèces botaniques, les picéasides sont majoritairement glycosylés chez *Picea* spp. (Li et al., 2008; Shen et al., 2009).

1.4.4. Les lignanes et néolignanes

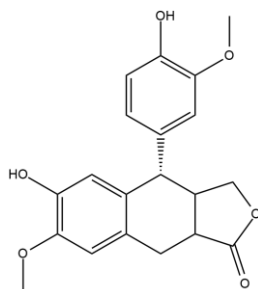
Structurellement très proche des lignines, les lignanes sont des dimères naturels de monolignols (phénylpropane), lié en C8-C8' (Figure 1.16). Lorsque la dimérisation n'est pas entre les deux carbones 8, les molécules sont des néolignanes (Stevanovic & Perrin, 2009). Leurs fonctionnalisations et cyclisations donnent lieu à de nombreuses molécules que l'on retrouve principalement dans les bois de cœur et les nœuds des conifères des genres *Picea*, *Pinus*, *Larix*, *Abies*, *Tsuga* et *Thuja* notamment. Des composés tels que le pinorésinol, l' α -conidendrine, le secoisolaricinol, et la cédrusine (Figure 1.16) ont été identifiés dans le bois, les nœuds et les écorces de *Picea* spp. (Garcia-Perez et al., 2012; Pan & Lundgren, 1995; Willför et al., 2004). Le 7-hydroxymatairesinol (Figure 1.16) a été identifié comme étant un composé majoritaire des extraits de nœuds de *Picea abies*, (Willför et al., 2004). De par leur structure, certains lignanes ont une activité mimant les oestrogènes. Considérés comme des phyto-œstrogènes, ils permettent de réguler les taux de ces hormones et pourrait ainsi prévenir les cancers hormono-dépendants tels que les cancers du sein, du colon et de la prostate (Cassidy et al., 2000).



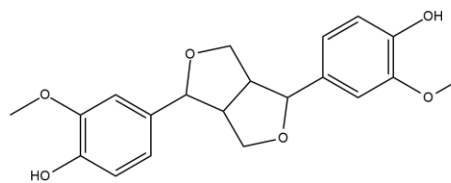
Squelette des lignanes



7-Hydroxymatairesinol



α -Conidendrine



Pinorésinol

Figure 1.16. Exemples de lignanes.

1.4.5. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent la famille de composés la plus large des polyphénols. Ils sont responsables de la couleur des fleurs et des fruits, assurent un rôle de protection contre les rayonnements ultraviolets et contre les pathogènes grâce à leurs propriétés antimicrobiennes et sont impliqués dans la reproduction (Bruneton, 1999). Les flavonoïdes sont composés d'un squelette de base en C₆-C₃-C₆, le 2-phénylchromane (Figure 1.17). Cette structure est issue de deux voies de biosynthèse; la voie du phénylpropane (cycle B) et la voie du mévalonate (cycle A) (Bruneton, 1999). Le cycle C est formé de la condensation des deux molécules de base, le malonyl CoA (voie du mévalonate) et du *p*-coumaroyl CoA (voie du phénylpropane). Les cycles A et C constituent le noyau chromane (Crozier et al., 2008). Les isoflavonoïdes sont des isomères des flavonoïdes, constitués d'un squelette 3-phénylchromane (Figure 1.17). Principalement retrouvés chez les légumineuses, ils sont, comme certains lignanes, des phyto-œstrogènes (Cassidy et al., 2000).

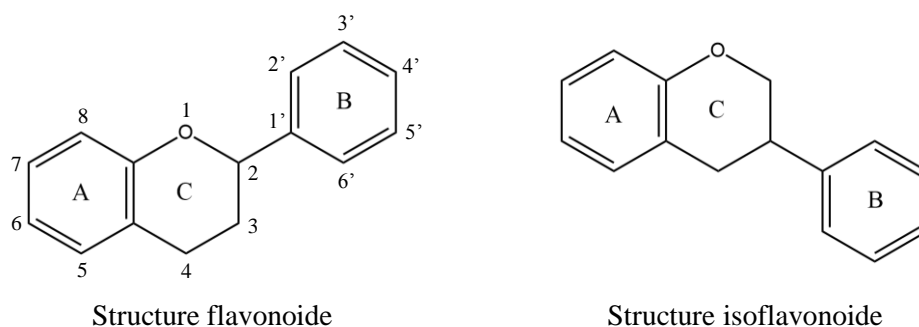


Figure 1.17. Structure des flavonoïdes.

Différentes catégories de flavonoïdes existent, classées selon leurs structures chimiques. Représentant la majorité des flavonoïdes *stricto sensu*, les flavones et flavonols (Figure 1.18) sont le plus souvent sous forme glycosylée. L'apigénine, la lutéoline, le kaempférol, l'isorhamnétine et la quercétine sont quelques exemples d'aglycones les plus répandus. Des dérivés glycosylés de ces trois derniers ont notamment été identifiés dans les genres *Picea* et *Abies* (Pan & Lundgren, 1995; Slimestad, 2003; Song et al., 2011).

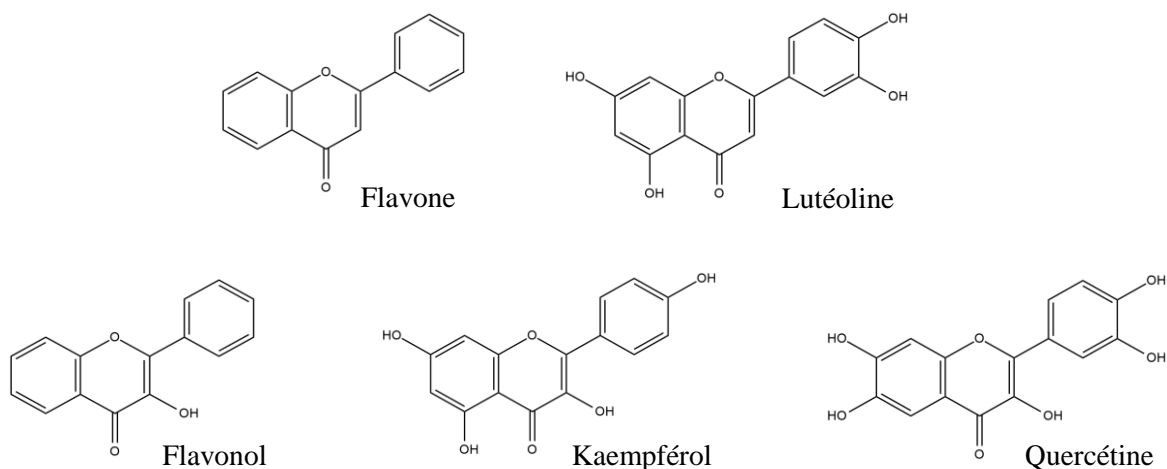


Figure 1.18. Structures des flavones et flavonols et exemples de molécules.

Les flavanones et dihydroflavonols (Figure 1.19) sont caractérisés par l'absence d'une double liaison en position 2 et 3 (Figure 1.17) et donc par l'existence de centres chiraux. Un glucoside de naringénine a notamment été identifié chez *Picea* et *Abies* spp. (Slimestad, 2003).

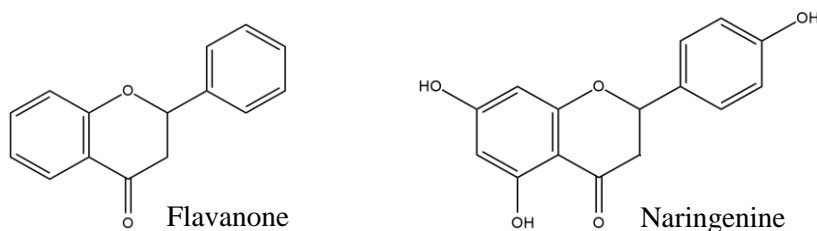


Figure 1.19. Structure des flavanones et exemple de molécule

Les flavan-3-ols sont une des classes les plus complexes des flavonoïdes. Représentés par les unités de base de catéchine et épicatechine (Figure 1.20), les flavan-3-ol peuvent polymériser pour former les complexes de proanthocyanidines ou tanins condensés.

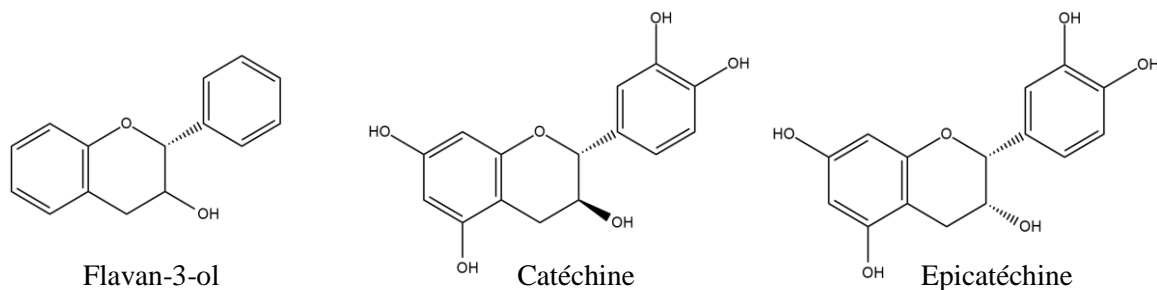


Figure 1.20. Structure des flavan-3-ols et exemples.

Les anthocyanidines sont les pigments rouges, bleus et violets des végétaux. Conjugués à des sucres (sur l'hydroxyle en C3), ils sont appelés anthocyanines. Les structures les plus fréquentes d'anthocyanidines sont la cyanidine, le delphinidine, la pélargonine et la malvidine (Stevanovic & Perrin, 2009) (Figure 1.21).

Les chalcones et aurones sont des pigments jaunes des plantes. Ce sont des flavonoïdes à cycle pyranique (cycle C) ouvert pour les chalcones et fermé à 4 carbones pour les aurones (Figure 1.22).

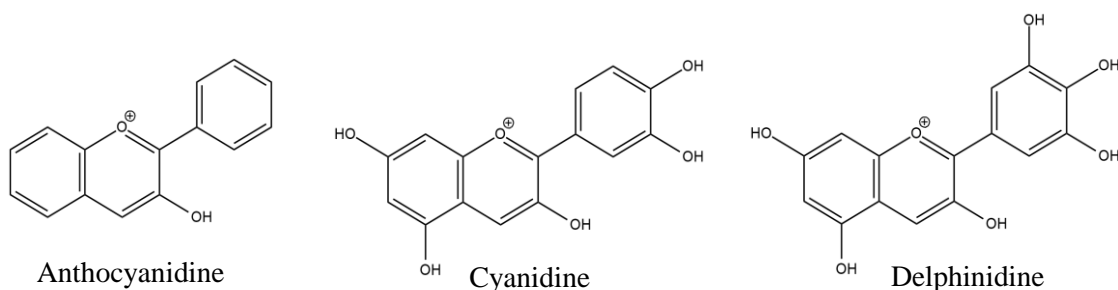


Figure 1.21. Structure des anthocyanines et exemples de molécules.

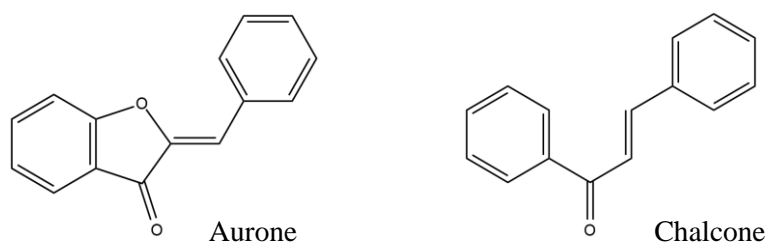


Figure 1.22. Structure des chalcones et aurones.

1.4.6. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols oligomères et polymères de masses moléculaires comprises entre 500 et 3000 daltons. Réputés pour leurs propriétés tannantes du cuir, les tanins ont la capacité de créer des liaisons entre les fibres collagènes des peaux, leur conférant une résistance à l'eau. Les tanins peuvent précipiter les protéines et les macromolécules telles que la cellulose. Leur astringence caractéristique s'explique d'ailleurs par la précipitation des glycoprotéines de la salive (Bruneton, 1999). Quelques exemples de tanins issus d'arbres forestiers sont les tanins de châtaignier (*Castanea sativa*), de chêne (*Quercus robur*) ou de quebracho (*Schinopsis* spp.). Deux groupes de tanins existent chez les végétaux supérieurs : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

1.4.6.1. Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des oligo- ou polyesters d'un sucre (le plus souvent de glucose) et d'acides phénols greffés sur ses fonctions hydroxyles (Figure 1.23). Ils existent deux catégories de tanins hydrolysables : les gallotanins formés d'acides galliques et les ellagitanins formés d'acides hexahydroxydipheniques, acides ellagiques et dérivés. Les tanins hydrolysables ne sont pas synthétisés par les conifères (Stevanovic & Perrin, 2009).

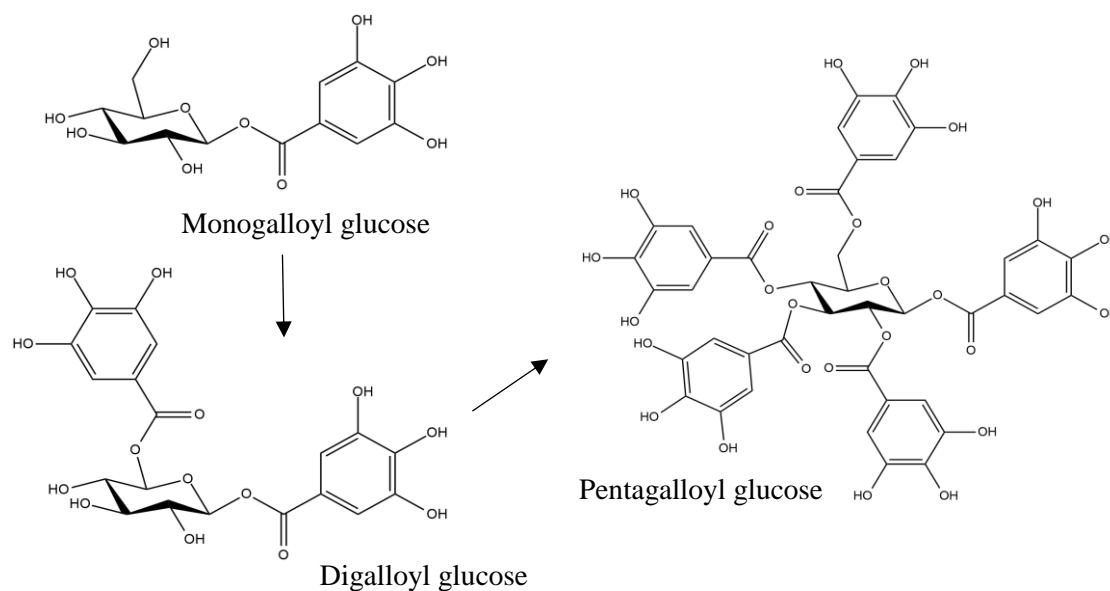


Figure 1.23. Biosynthèse des gallotanins avec ajout successif d'unités galloyl.

1.4.6.2. Les tanins condensés

Les tanins condensés, aussi appelés proanthocyanidines sont des polymères de flavan-3-ols et de flavan-3,4-diols. Les unités monomériques sont assemblées entre elles par des liaisons de type B, résultant de la liaison d'un C4 électrophile avec le C8 ou C6 (plus rare) nucléophile d'une autre unité (Figure 1.24). D'autres types de liaison existent, comme la liaison de type A entre un oxygène et le C2 d'une autre unité flavanique (Figure 1.25) (Crozier et al., 2008). La diversité des monomères ainsi que des types de liaisons interflavanes donnent lieu à une grande diversité de proanthocyanidines. Chez les conifères, les types de tanins les plus répandus sont les procyanidines, constitués d'unités de catéchine et d'épicatéchine et les prodelphinidines formés de gallocatéchine et d'épigallicatéchine (Stevanovic & Perrin, 2009).

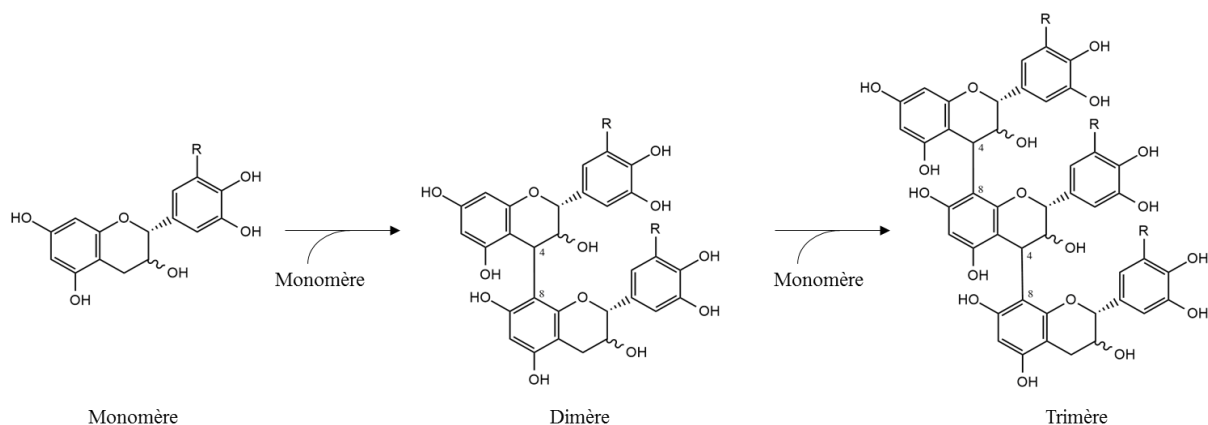


Figure 1.24. Biosynthèse des proanthocyanidines oligomères et polymères (Stevanovic & Perrin, 2009), R = H, procyanidine, R = OH, prodelphinidine.

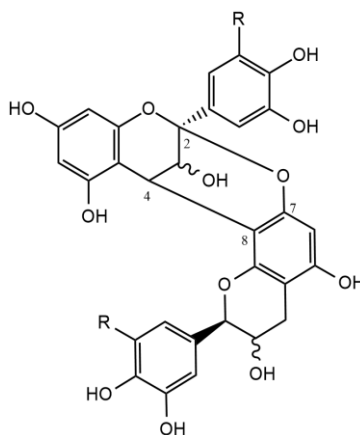


Figure 1.25. Proanthocyanidine dimère avec liaisons de type A (2β-O-7) et B (C4-C8).

1.5. Les méthodes d'extraction

1.5.1. Extraction des molécules hydrophobes : les terpènes volatils

1.5.1.1. La méthode conventionnelle : l'hydrodistillation

L'hydrodistillation est une des plus anciennes méthodes d'extraction et de séparation de substances organiques à partir d'une matrice végétale.

Le principe de l'hydrodistillation est de créer un flux de vapeur d'eau qui va pouvoir entraîner les composés volatils odorants. Dans un premier temps, les structures cellulaires détruites par la chaleur et la vapeur, libèrent les molécules qu'elles contiennent. Les plus volatiles d'entre elles vont alors s'évaporer dans un mélange hétérogène de molécules organiques et d'eau. Cette vapeur chargée en composés est ensuite condensée par refroidissement lors de son passage dans un réfrigérant. Le distillat obtenu se sépare en deux phases distinctes : la phase organique ou huile essentielle (qui surnage dans la plupart des cas) et la phase aqueuse, appelé hydrolat (Monin, 2012).

Les rendements d'extraction pour les huiles essentielles de conifères sont en général assez faibles, mais correspondent à un ordre de grandeur acceptable dans l'industrie de production des huiles essentielles. Parmi les huiles essentielles de conifères, les rendements varient entre 0,4 et 1,4% (Tableau 1.1) (Tremblay, 1974).

Tableau 1.1. Rendements moyens d'huiles essentielles de conifères.

Huile essentielle	Rendements moyens
Cèdre feuillage (<i>Thuja occidentalis</i>)	0,6 à 1,0 %
Sapin baumier feuillage (<i>Abies balsamea</i>)	1 ,0 à 1,4%
Pin feuillage (<i>Pinus sylvestris</i>)	0,6 à 1,0%
Épinette noire feuillage (<i>Picea mariana</i>)	0,5 à 0,7%
Pruche feuillage (<i>Tsuga canadensis</i>)	0,4 à 0,6%

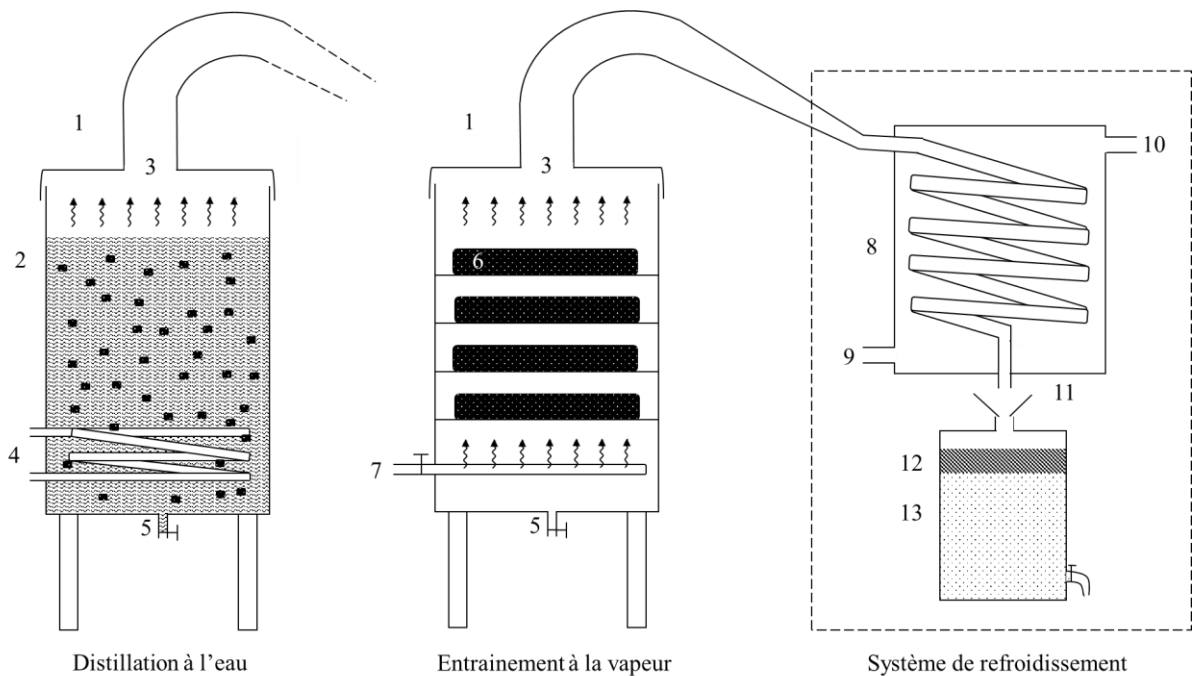
Bien que des procédés plus efficaces énergétiquement gagnent en popularité, les deux méthodes d'hydrodistillation utilisées en routine dans l'industrie productrice d'huiles essentielles sont la distillation à l'eau et l'entraînement à la vapeur. Il est à noter également

que d'un point de vue réglementaire, seules les techniques conventionnelles d'extraction (hydrodistillation, pression et distillation sèche) permettent d'obtenir des produits appelés huiles essentielles. Les produits issus d'autres techniques sont appelés « extraits aromatiques » (Chémat et al., 2012).

1.5.1.1.1. La distillation à l'eau

La méthode d'extraction la plus simple est la distillation à l'eau (Figure 1.26). La matière première est immergée dans l'eau bouillante qui génère un flux de vapeur entraînant l'huile essentielle. Préconisée pour les matériaux plus difficiles à extraire, la distillation à l'eau permet une meilleure surface de contact entre l'eau et la matière grâce à l'agitation créée par l'ébullition.

Les matières premières dures (comme les bois, les grains, les écorces) doivent être fragmentées avant la distillation. Cela peut se faire en présence d'eau, dans le cas des turbines de broyage humide (l'eau est ensuite réutilisée pour la distillation). Les alambics peuvent également être équipés d'un système de pales d'agitation permettant le mélange des particules de biomasse dans le cas d'une distillation à l'eau. Ce mouvement évite que les particules se collent aux parois des conteneurs, ce qui peut entraîner la production de notes brûlées indésirables dans l'huile essentielle. Ce système s'appelle la turbo-distillation : il permet une très grande agitation couplée à un effet de cisaillement de la matière, réduisant les temps de distillation d'un facteur 2 à 3 (Baser & Buchbauer, 2009; Chémat et al., 2012a). Ce procédé est très utile pour extraire les huiles essentielles à partir des épices ou des bois, qui sont assez difficiles à extraire (Li et al., 2014). Le broyage peut également s'effectuer à sec, avant la distillation.



1 : alambic, 2 : matière première immergée dans l'eau, 3 : vapeur d'eau entraînant les molécules volatiles, 4 : chauffage, 5 : sortie de vidange, 6 : matière première sur faux-fonds, 7 : entrée de vapeur, 8 : réfrigérant 9 : entrée d'eau pour réfrigération, 10 : sortie d'eau pour réfrigération, 11 : sortie du distillat, 12 : huile essentielle, 13 : eau de distillation ou hydrolat.

Figure 1.26. Schéma d'une installation pour distillation à l'eau et entraînement à la vapeur des huiles essentielles à grande échelle. Le système de refroidissement est le même pour les deux types d'hydrodistillation.

1.5.1.1.2. L'entraînement à la vapeur

Ce procédé met en jeu une source de vapeur externe qui diffuse à travers la matière première placée dans la cuve, emportant les molécules volatiles (Figure 1.26). Lorsque la matière première est fragile (comme c'est le cas pour la rose ou le jasmin), elle est chargée sur des plaques (appelé aussi faux-fond) permettant de créer plusieurs étages. L'avantage ici est de maximiser la surface d'échange entre la matière végétale et la vapeur, et également d'éviter la compaction (Baser & Buchbauer, 2009). Lorsqu'il s'agit de plantes entières telle que la lavande ou de branchages comme du sapin, la matière première est chargée telle quelle dans la cuve.

L'entraînement à la vapeur est la méthode la plus utilisée car elle a les avantages d'éviter les surchauffes et de diminuer les temps de distillation. L'entraînement à la vapeur est une

technique plus douce, préconisée pour les matières premières fragiles comme les fleurs ou les feuilles. Elle est néanmoins déconseillée pour les poudres (bois ou écorces broyés par exemple) car la vapeur a tendance à les agglomérer (Guenther, 1952).

1.5.1.2. Les extractions aux solvants : concrètes, résinoïdes et absolues

Les extractions aux solvants volatils apolaires (hexane, éther diéthylique, benzène, éther de pétrole, dichlorométhane...) permettent d'extraire les molécules lipophiles de la matière première. Il s'agit des terpenoïdes volatils et non volatils, des cires et des graisses. Les extractions peuvent se pratiquer à chaud (comme c'est le cas du Soxhlet) ou à température ambiante lors d'une macération à froid. Dans l'industrie des huiles essentielles, des produits spécifiques sont issus de ces extractions aux solvants. Il s'agit des concrètes, résinoïdes et absolues (Chémat, 2012).

La matière première chargée dans des cuves est « épuisée » avec le solvant apolaire (souvent l'hexane). Le solvant récupéré, riche en molécules lipophiles, est évaporé à basse température. Le résidu solide aromatique obtenu est appelé concrète (ou résinoïde brut dans le cas de matière première sèche ou de gomme-résine) (Chémat, 2012). Afin d'éliminer les molécules lourdes, comme les cires et les graisses qui n'entrent pas dans la composition de la fragrance du produit, la concrète est extraite à l'éthanol à basse température sous forte agitation. L'extrait obtenu après filtration des cires se nomme l'absolue.

Utilisées pour des matières premières fragiles ou à faibles rendements (rose, jasmin, benjoin), les extractions des concrètes, résinoïdes et absolues donnent des produits olfactivement différents des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation. Ce sont des extraits essentiellement utilisés en parfumerie.

1.5.1.3. Nouvelles méthodes d'extraction

1.5.1.3.1. L'extraction assistée par micro-ondes

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (Solvent Free Microwave Extraction, SFME) permet d'extraire l'huile essentielle des plantes sans ajout d'eau ou de vapeur

(excepté dans le cas des matières sèches pour lesquelles une quantité d'eau restreinte est ajoutée). Le principe utilise l'eau naturellement présente dans la matière première comme vecteur des molécules volatiles; le chauffage par micro-ondes permet de vaporiser cette eau entraînant l'huile essentielle. Cette technique est cinq à dix fois plus rapide que la distillation classique et permet une extraction à des températures inférieures à 100 °C, évitant la dégradation thermique de certaines molécules (Chémat et al., 2012a). Bien que plus économe en énergie, ce procédé n'est encore que peu utilisé industriellement comparé à l'hydrodistillation (Baser & Buchbauer, 2009).

1.5.1.3.2. L'extraction CO₂ ou extraction aux fluides supercritiques

Le CO₂ à l'état supercritique est un fluide aux propriétés de diffusion et de densité élevée permettant son utilisation pour l'extraction des molécules volatiles d'un végétal. Le fluide supercritique traverse la matière première et se charge en composés. Lors de la détente, le passage en phase gazeuse du CO₂ permet sa séparation de l'extrait (Chémat et al., 2012a). Ce procédé permet une extraction douce qui ne dénature pas les molécules; le parfum des extraits obtenus étant souvent rapporté comme plus proche olfactivement du végétal frais. Le CO₂ a aussi l'avantage d'être abondant, peu coûteux et non toxique. Cependant, ce type de procédé requiert un investissement important pour l'achat du matériel, et consomme énormément d'énergie pour atteindre l'état supercritique (conditions de pression au-delà de 74 bars et de température de 31 °C) (Chémat et al., 2012a).

1.5.1.3.3. L'extraction par l'eau sous-critique

Ce procédé utilise l'eau chaude à son point sous-critique : entre 100 °C (son point d'ébullition) et 374,1 °C (son point critique), maintenue liquide sous forte pression (entre 1 et 221 bars). À l'état sous-critique, l'eau possède des propriétés différentes, permettant la solubilisation de molécules peu polaires. Ainsi, l'extraction des molécules volatiles peu polaires voire apolaires comme les composants des huiles essentielles est permise par l'abaissement de la polarité de l'eau, sans ajout de solvant organique.

Cette technique, qui ne requiert que l'eau, le solvant vert par excellence, est néanmoins coûteuse à l'achat et en énergie (Chémat et al., 2012a).

1.5.1.3.4. La détente instantanée contrôlée

La détente instantanée contrôlée est un procédé permettant la vaporisation des molécules contenues dans une matrice végétale par une détente abrupte vers le vide. La matière première est chauffée à haute température (180 °C) et haute pression (10 bars) pendant un court laps de temps. La détente vers le vide crée une vaporisation des molécules volatiles et de l'eau. Ce procédé rapide et sans solvant a néanmoins l'inconvénient de former une émulsion stable des huiles essentielles dans l'eau, empêchant la ségrégation physique des deux phases et donc la récupération d'une phase organique intègre chargée en composés aromatiques (Chémat et al., 2012a).

1.5.2. Extraction des molécules hydrosolubles : les polyphénols

1.5.2.1. Méthodes conventionnelles

1.5.2.1.1. Macération

L'extraction par macération consiste en une simple immersion de la matière végétale dans un solvant à température ambiante. Le mélange solide-liquide est maintenu sous agitation pendant plusieurs jours dans le but de saturer le solvant en molécules à extraire (Palma et al., 2013). Considérée comme une méthode traditionnelle, la macération permet d'extraire efficacement les polyphénols grâce à l'utilisation de solvants polaires adaptés (éthanol, méthanol, acétone...) tout en préservant l'intégrité de certaines molécules thermosensibles. Cependant, cette méthode est coûteuse en solvants souvent toxiques et nécessite des temps d'extraction très longs (Khoddami et al., 2013).

Il est possible de diminuer les temps d'extractions en augmentant la température. Un montage à reflux avec un réfrigérant est alors nécessaire pour recondenser les vapeurs du solvant. Cette technique est appelée l'extraction à l'eau chaude.

1.5.2.1.2. Soxhlet

Ce procédé utilise la vaporisation des solvants chauffés à leur température d'ébullition pour extraire en continu la matière première contenue dans une cartouche. Le solvant recondensé par le réfrigérant s'accumule dans la cartouche, reproduisant le phénomène de macération. Lorsque trop de solvant chargé en composés est accumulé, un système de siphon le renvoi au point de départ (dans le ballon) et le cycle peut recommencer. Les molécules extraites n'ayant pas la même volatilité que le solvant, seul le solvant pur est re-vaporisé (Palma et al., 2013). Les polyphénols peuvent être extraits au soxhlet avec des solvants polaires (jusqu'à 90 °C de température d'ébullition).

1.5.2.2. Nouvelles méthodes

Les nouvelles méthodes d'extractions décrites plus haut pour les huiles essentielles (extraction assistée par micro-ondes, par des fluides supercritiques comme le CO₂ ou par eau sous-critique) peuvent être adaptées à l'extraction des molécules hydrosolubles par l'ajout d'un solvant polaire (Chémat et al., 2015; Kulkarni et al., 2008; Tena et al., 1998).

1.5.3. Paramètres influençant l'extraction

Une extraction optimisée de composés à partir d'une matrice végétale doit avoir un rendement élevé ainsi qu'une haute sélectivité. Les hauts rendements assurent des taux suffisants en composés d'intérêts et la haute sélectivité permet de minimiser la co-extraction de molécules indésirables. Plusieurs facteurs peuvent influencer la concentration de molécules d'intérêts dans un extrait : la température, la durée d'extraction, le choix du solvant, le ratio matière/solvant... Ils sont à adapter en fonction de la structure de la matrice végétale et des particularités physico-chimiques des composés ciblés.

Les écorces sont une matière première dure. En conséquence, elles nécessitent un broyage afin de sélectionner une granulométrie adéquate : des particules trop fines peuvent colmater les filtres et des particules trop grosses peuvent affecter le rendement (Geoffroy et al., 2017). Le ratio matière première/solvant influe principalement sur la saturation du solvant en composés (Khoddami et al., 2013). Le choix du solvant est un facteur important car il impacte

la sélectivité et la solubilité des composés (Palma et al., 2013). Des solvants apolaires comme l'hexane vont capturer des composés hydrophobes tels que les graisses, les cires et les terpènes alors que des solvants polaires comme l'éthanol ou l'eau vont extraire des composés hydrosolubles comme les sucres ou les polyphénols. La sélectivité de ces solvants peut être modulée par la température et la durée d'extraction, cependant certaines molécules peuvent être dégradées par des durées trop longues ou des températures trop élevées (Khoddami et al., 2013).

L'étude de l'influence des paramètres d'extraction dans un procédé s'effectue grâce à une optimisation de l'extraction, à partir d'un plan d'expérience défini et d'analyses statistiques.

1.6. Les extraits d'épinette noire

1.6.1. Extraits polyphénoliques

1.6.1.1. Composition chimique

La composition relative des extraits naturels de plantes peut être évaluée grâce à des tests colorimétriques identifiant les différentes familles chimiques de composés. Les extraits polyphénoliques produits à partir d'écorce d'épinette noire contiennent des taux importants de polyphénols, rapportés entre $346,9 \pm 4,3$ et $404,3 \pm 4,0$ mg d'acide gallique équivalent GAE /g d'extrait brut (Garcia-Perez et al., 2010; Royer et al., 2013). Différentes familles de polyphénols ont été identifiées dans ces extraits : des flavonoïdes, des acides cinnamiques et des tanins condensés (ou proanthocyanidines). De nombreuses molécules ont été extraites dans différentes parties de l'arbre. Deux alcaloïdes, l'épidihydropinidine et le pinidinol (Schneider et al., 1991) et des glycosides de kaempférol, de quercétine et d'isorhamnetine (Slimestad, 2003) ont été identifiés dans des extraits au méthanol des aiguilles. Dès 1953, la présence de polyphénols est mise en évidence dans l'écorce interne de l'épinette noire (Pigman et al., 1953; Hiscock, 1956). Certains de ces polyphénols ont été identifiés dans l'extrait à l'acétone de l'écorce entière tels que la taxifoline, la catéchine, l'épicatéchine ou encore quelques stilbènes comme l'astringine, l'astringénine (ou picéatannol), l'isorhapontine et l'isorhapontigénine (Manners & Swan, 1971). Plus récemment, la présence de taxifoline, de catéchine et d'épicatéchine a été confirmée dans les écorces, mais cette fois

dans l'extrait brut aqueux (Diouf et al., 2009). Les tanins condensés concentrés dans l'extrait aqueux ont fait l'objet d'une caractérisation par Diouf et al. (2013). À partir des extraits de bois de cœur et de nœuds d'épinette noire, ont été rapportés plusieurs lignanes tels que le 7-hydroxymatairésinol, l'allo-hydroxymatairésinol, le secoisolaricirésinol, le laricirésinol, le matairésinol, le pinorésinol, l' α -conidendrine et le cyclolaricirésinol (Willför et al., 2004).

Une autre étude sur la composition de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait aqueux d'écorce confirme la présence de lignanes et donne un premier aperçu de la complexité et de la diversité de la gamme de polyphénols de petit poids moléculaire présents (Garcia-Perez et al., 2012). Vingt-huit molécules ont été identifiées dont des lignanes et néolignanes, un diterpène l'acide 7-oxo-15-hydroxydéhydroabiétique, des acides phénoliques comme l'acide *p*-coumarique et l'acide vanillique, des flavonoïdes comme la mearnsétine, la pallasine et la taxifoline, et un seul stilbène, le *trans*-resvératrol. Cependant, aucune étude complète de l'extrait brut aqueux n'a été effectuée jusqu'à présent.

1.6.1.2. Une molécule phare, le *trans*-resvératrol

Parmi les composés phénoliques d'intérêt thérapeutique, la molécule de *trans*-resvératrol a fait l'objet de nombreuses études. Plusieurs bioactivités ont été reportées : anti-inflammatoire, inhibiteur de peroxydation lipidique, modulation du métabolisme lipidique, antiagrégant plaquettaire, anti-cancer... (Frémont, 2000; Soleas, 2001). Le *trans*-resvératrol possède également une activité antioxydante, souvent supérieure aux molécules standards comme l' α -tocophérol ou la vitamine C (Soleas, 2001).

Très étudié dans le raisin et le vin rouge, le resvératrol a acquis sa réputation grâce à l'hypothèse selon laquelle il serait à l'origine du « French paradox ». Dans le vin rouge, sa concentration varie entre 0,1 et 15 mg/L (Frémont, 2000). Ce stilbène est également présent dans d'autres sources alimentaires telles que le chocolat et les arachides et non-alimentaires telles que les racines de *Polygonum cuspidatum*, une herbe médicinale sino-japonaise et l'écorce d'épinette noire (Garcia-Perez et al., 2012). En terme de concentration, le taux de *trans*-resvératrol dans la fraction acétate d'éthyle de l'extrait aqueux d'écorce d'épinette noire s'élève à 502,95 mg/100 g d'extrait sec (Garcia-Perez et al., 2012). Bien que très

inférieur à celui de *Polygonum cuspidatum* (19719 mg/100 g d'extrait sec), ce taux est néanmoins supérieur à celui du vin rouge (337 mg/100 g d'extrait sec) ou de la peau de raisin rouge (60-75 mg/100 g d'extrait sec) (Counet et al., 2006). Ainsi, il semble donc très intéressant d'étudier plus en détails la présence et le taux de resvératrol dans les extraits aqueux d'écorce d'épinette noire.

1.6.1.3. Bioactivités

Connues des médecines traditionnelles amérindiennes, les écorces d'épinette noire étaient utilisées pour soigner diverses affections, telles que les douleurs dorsales, les maux d'estomac et les états de faiblesse générale par les Obijwas (Arnason et al., 1981), les inflammations cutanées par les Patawatonis (Smith, 1933) et les maux de gorge par les Micmacs (Arnason et al., 1981). Ce n'est que récemment que les chercheurs ont commencé à investiguer les essences des forêts boréales pour leurs propriétés thérapeutiques.

Comme précédemment identifié dans l'extrait standardisé de pin maritime Oligopin[®], l'activité antioxydante des extraits forestiers peut justifier leur emploi en tant qu'agents antioxydants naturels (Stevanovic et al., 2009), dans les secteurs de la nutrition fonctionnelle, de la cosmétique et de la santé.

Lors d'un screening de différentes espèces forestières boréales, l'extrait à l'eau chaude d'écorce d'épinette noire a démontré une des meilleures activités de piégeage de radicaux libres *in vitro* (anion super oxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle, radical oxyde nitrique et radical peroxyde) (Garcia-Perez et al., 2010). Diouf et al. (2009) ont reporté une activité anti-radicalaire contre le radical DPPH supérieure au BHT (hydroxytoluène buthylé), un additif antioxydant de synthèse utilisé en routine dans l'industrie agroalimentaire. Une activité anti-péroxydation lipidique, propriété essentielle en agroalimentaire afin d'empêcher le rancissement prématuré des aliments, a également été démontrée supérieure à celle de la vitamine C (Royer et al., 2013), molécule utilisée comme additif et conservateur. Statistiquement, ces activités sont toujours supérieures ou égales à la référence Oligopin[®], un extrait commercial purifié, enrichi en tanin antioxydant. L'extrait aqueux d'écorce d'épinette noire possède également un potentiel en tant qu'ingrédient cosmétique puisque

qu'il a démontré une activité d'inhibition sur deux enzymes clés impliquées dans le vieillissant de la peau : l'élastase et la tyrosinase (Royer et al., 2013). De plus, la non-toxicité sur lignée cellulaire et sur modèle vivant de l'extrait brut aqueux d'épinette noire est un argument important pour une future application industrielle que ce soit en alimentation fonctionnelle, en cosmétique ou encore en phytothérapie. Sa non-toxicité par administration orale a été démontrée sur des rats jusqu'à une concentration de 2000 mg/kg (Clinical Trial, 2012).

1.6.2. Huiles essentielles et extraits lipophiles

1.6.2.1. Composition chimique

Les aiguilles de l'épinette noire sont utilisées pour la production d'une huile essentielle, réputée pour ses propriétés en aromathérapie. Sa composition a été élucidée par Shaw en 1950 et référencée dans l'incontournable « The Essential oils » par Ernest Guenther (1952). L'huile essentielle, au rendement de 0,46%, est composée majoritairement d'acétate de bornyle (37%), d' α -pinène (16%), de camphène (10%) suivis de β -pinène (6,5%), de limonène (6,5%), de δ^3 -carène (5%) et minoritairement de myrcène (3,5%), santène (2,5%), tricyclène (1%), terpinolène (1%), camphre (1%) et bornéol (1%) (Shaw, 1950). Les huiles essentielles sont des produits souvent à faible rendement mais à très haute valeur ajoutée. Les rendements de distillation dépassent rarement les 1% pour les huiles essentielles de conifères (Tremblay, 1974).

Un hydrolat est produit en même temps, comme coproduit de distillation. Il correspond à la phase aqueuse qui est recondensée avec l'huile essentielle surnageante. L'hydrolat contient un certain pourcentage de composés volatils odorants dissouts, principalement des terpénoïdes oxygénés, ayant une plus grande affinité avec l'eau que les terpènes hydrocarbures. Étudié par Garneau et al. (2012), l'hydrolat issu de l'hydrodistillation des aiguilles d'épinette noire est riche en α -terpinéol (14,8%), bornéol (13,5%), acétate de bornyle (7,8%), et terpinen-4-ol (6,5%). Sa teneur en composés organiques a été évaluée à 260 mg/L.

Des molécules terpéniques ont aussi été identifiées dans l'extrait hexanique du bois d'épinette noire : quelques monoterpénoïdes α -pinène, β -pinène, α -terpinéol, et majoritairement des diterpénoïdes manoyl oxyde, 13-épi-manoyl oxyde, manool, isoabiéanol, neoabiéanol, (Z)-abiéanol, pimarane diterpène (Pichette et al., 1998). Dans l'huile obtenue suite au procédé de mise en pâte Kraft (tall oil) à partir du bois d'épinette noire, les acides résiniques : pimarique, sandaracopimarique, palustrique, lévopimarique, isopimarique, abiétique, déhydroabiétique et néoabiétique ont été mis en évidence, ainsi que plusieurs acides gras : palmitique, stéarique, oléique, linoléique, 5,9,12-octadécatriénoïque, 5,11,14-eicosatriénoïque et béhénique (Conner et al., 1980). Des extractibles lipophiles (environ 45 mg/g d'écorce) ont été rapportés dans l'écorce d'épinette noire, notamment des phytostérols, les acides abiétique et déhydroabiétique ainsi que plusieurs acides gras à longues chaînes (Zhang, 2004).

Deux triterpènes, l' α - et la β -amyrine, ont été identifiés dans l'écorce, les branches et les aiguilles de *Picea mariana*, ainsi que plusieurs phytostérols, le β -sitostérol, le stigmastérol et le campestérol (Conner et al., 1980; Hooper & Chandler, 1984; Wise & Moore, 1945).

L'écorce de l'épinette noire n'a jamais été investiguée pour la production d'une huile essentielle, sachant que tout comme les aiguilles, elle contient de la résine riche en molécules volatiles odorantes.

1.6.2.2. Bioactivités

Les propriétés antiseptiques, stimulantes et aromatiques des terpénoïdes contenus dans la résine de l'épinette noire étaient connues des peuples des Premières Nations. La résine était utilisée comme laxatif par les Obijwas, comme calmant par les Algonquins, contre les maux de gorge et de ventre par les Cris (Arnason et al., 1981), en décoction (de la gomme ou des aiguilles) contre les infections respiratoires par les Inuktituts et en pommade ou pâte contre les plaies infectées, les coupures et les brûlures par les Cris et les Inuktituts (Arnason et al., 1981; Bérubé-Gagnon, 2006). À ce jour, aucune étude ne semble avoir été conduite sur les bioactivités de l'huile essentielle d'aiguille d'épinette noire ou sur sa résine.

1.7. Valorisation de la biomasse forestière

La valorisation des résidus de transformations comme source de molécules bioactives fait l'objet d'un intérêt croissant, notamment dans les industries de l'agroalimentaire et des huiles essentielles (Peschel et al., 2006). De nombreuses recherches ont mis en lumière la possibilité d'extraire des quantités importantes de molécules antioxydantes à partir des résidus solides et liquides d'extraction (Balasundram et al., 2006; Moure et al., 2001). Des polyphénols bioactifs dont plusieurs glycosides de quercétine et de kaempférol ont été isolés à partir des eaux de distillation issues de la production de l'huile essentielle de rose (Rusanov et al., 2014). Les résidus solides après hydrodistillation ont aussi été identifiés comme source de molécules d'intérêt. Une étude sur le romarin (Navarrete et al., 2011) s'est intéressée à l'extraction à l'éthanol de la matière première épuisée de son huile essentielle. Il en résulte que ces résidus d'hydrodistillation contiennent des taux intéressants de composés antioxydants tels que les acides rosmarinique et carnosique, et le carnosol. Des protocoles d'extraction ont même été conçus pour récupérer plusieurs produits en même temps. C'est le cas de l'étude sur la plante *Alpinia zerumbet*, à partir de laquelle sont extraits une huile essentielle, un extrait riche en polyphénols et une molécule d'intérêt spécifique, le dihydro-5,6-dehydrokawain (Elzaawely et al., 2007).

De nombreuses études se sont penchées sur la valorisation des résidus de l'industrie forestière et de transformation du bois pour la production d'extraits naturels. À partir des eaux d'écorçage de l'épinette de Norvège (*Picea abies*), issues du procédé d'écorçage des troncs dans les usines de pâtes et papiers, ont été rapportés des taux importants de stilbènes antifongiques dont le *trans*-resvératrol (Hedenström et al., 2016). Des résidus d'*Eucalyptus globulus* provenant de l'industrie du placage ont été investigués pour la production d'extraits antimicrobiens (Fernández-Agulló et al., 2015). Une huile essentielle a été produite à partir de la biomasse forestière récoltée suite à une exploitation forestière commerciale et l'impact de son stockage prolongé sur la qualité et la quantité de l'huile a été déterminé (Khan et al., 2014). Une huile essentielle d'écorce de sapin baumier (*Abies balsamea*) a également été produite (Ross et al., 1996). Cependant, l'exemple le plus réussi est l'extrait d'écorce de pin maritime, de noms commerciaux Oligopin[®] et Pycnogenol[®]. Enrichi en proanthocyanidines antioxydants, ce produit a fait l'objet de multiples publications scientifiques rapportant des

propriétés anti-inflammatoires, cardiovasculaires et antidiabétiques, et des actions contre les œdèmes, l'hypertension et les migraines (D'Andrea, 2010). L'extrait de pin maritime représente un modèle de valorisation d'un résidu de transformation du bois.

1.8. Objectifs de la recherche

L'objectif général de ce projet de doctorat est de proposer de nouvelles voies de valorisation de l'écorce de l'épinette noire issue des scieries canadiennes, par le développement de produits naturels à haute valeur ajoutée.

Plusieurs hypothèses de recherche ont permis de développer trois grands axes dans ce projet qui ont fait l'objet de trois articles scientifiques originaux.

Hypothèse de recherche 1 : Sachant qu'une huile essentielle est produite industriellement à partir des aiguilles de l'épinette noire, et que l'écorce de l'épinette noire contient également de la résine terpénique, il semble possible d'extraire une huile essentielle de l'écorce.

Objectif 1. Production d'une huile essentielle d'écorce (Article 1) :

- Produire une huile essentielle en appliquant deux méthodes d'hydrodistillation et les comparer,
- Élucider la composition des huiles essentielles et des hydrolats produits selon les deux méthodes.

Hypothèse de recherche 2 : Il semble possible de produire un extrait à l'eau chaude en même temps que l'huile essentielle.

Objectif 2. Conception d'un procédé intégré (Article 2) :

- Développer un procédé intégrant les deux types d'extractions dans la même cuve (extraction à l'eau chaude et hydrodistillation) à l'aide d'une réadaptation des équipements disponibles en laboratoire,

- Comparer la composition chimique des extraits bruts aqueux obtenus par le procédé intégré à celle de l'extrait obtenu par extraction à l'eau chaude simple.

Hypothèse de recherche 3 : L'extraction à l'eau chaude peut être optimisée afin de récupérer une quantité plus importante de polyphénols d'intérêt.

Objectif 3. Optimisation de l'extraction à l'eau chaude pour valider la composition chimique de l'extrait brut aqueux (Article 3) :

- Déterminer les meilleurs paramètres d'extraction (température, durée, ratio matière-eau) via un plan factoriel et des analyses statistiques,
- Déterminer, parmi les 18 extraits produits par le plan factoriel, ceux contenant le plus de molécules d'intérêt,
- Élucider la composition chimique de l'extrait aqueux brut,
- Valider cette composition en étudiant les 18 extraits.

Chapitre 2 Méthodologies

2.1. Préparation et conditionnement du matériel végétal

L'écorce fraîche d'épinette noire nécessaire au projet a été fournie par l'entreprise Boisaco Inc, située à Sacré-Coeur, Québec, Canada. Les essences d'épinette noire proviennent de la côte nord, secteur Labrieville, à environ 140 km de Forestville, Québec, Canada. Les écorces fournies ont été récoltées à partir de l'écorçage de troncs manipulés dans la scierie Boisaco. Au laboratoire, les écorces ont été nettoyées et séparées des restes de bois. Elles doivent être exemptes de signes d'attaques microbiennes ou d'insectes. Deux conditionnements sont appliqués selon le type d'extrait à obtenir. Pour l'extraction à l'eau chaude, les écorces sont séchées à température ambiante pour atteindre environ 7% d'humidité finale. Puis elles sont broyées grossièrement à l'aide d'un broyeur BearCat (grille de sortie à ouverture de 2 cm) puis finement avec un broyeur à marteau. La sciure d'écorce est ensuite tamisée et les particules entre 0,5 et 0,25 mm sont sélectionnées pour l'extraction. Pour l'hydrodistillation, les écorces ne sont pas séchées (environ 60% d'humidité), afin d'éviter la perte des molécules volatiles odorantes et sont conservées à -20 °C. Elles sont broyées grossièrement avec le broyeur BearCat et directement tamisées pour sélectionner une granulométrie entre 1 et 2 mm. Les étapes de broyage/tamissage sont plus complexes pour les écorces fraîches car la matière première a tendance à s'agglomérer dans les petits broyeurs et sur les tamis trop fins.

2.2. Les procédés

2.2.1. Hydrodistillation et conception du procédé intégré

2.2.1.1. Essais préliminaires en laboratoire

Les premiers essais d'hydrodistillation de l'écorce de l'épinette noire ont été effectués en laboratoire afin de déterminer s'il était possible d'en extraire une huile essentielle. Les premiers essais d'entraînement à la vapeur ont été réalisés sur un autoclave de type Presto, avec une source externe de chaleur (chauffe-plat) et connecté à un réfrigérant. 100 à 500 g d'écorce ont été hydrodistillées sur plusieurs essais par une source de vapeur constituée par

4 L d'eau portée et maintenue à ébullition. La formation d'une mince couche d'huile essentielle à la surface de l'eau de distillation (hydrolat) a permis de valider l'hypothèse selon laquelle une huile essentielle pouvait être extraite des écorces. De plus, la présence d'une eau résiduelle de coloration marron en fond de cuve a soulevé l'idée qu'une extraction aqueuse des molécules hydrosolubles pouvait avoir lieu en même temps. Une distillation à l'eau avec immersion totale de la matière première dans l'eau a également été tentée à l'échelle laboratoire avec un montage en verrerie, mais n'a pas apporté de meilleurs résultats quant à la production d'huile essentielle.

2.2.1.2. Adaptation et amélioration du matériel

Pour augmenter les quantités d'huile essentielle obtenue, deux options ont été envisagées : augmenter les quantités de matière première et améliorer l'efficacité du procédé. Pour ce faire, un extracteur de capacité 20 L avec système de diffusion interne de vapeur a été réadapté dans nos laboratoires. Initialement conçu pour l'entraînement à la vapeur, il possédait toutes les caractéristiques nécessaires pour effectuer une hydrodistillation d'huile essentielle. De plus, la connexion à une source de vapeur externe (vapeur de l'université) présentait un gain considérable d'efficacité comparé à la vapeur générée à l'échelle laboratoire par un chauffe-plat. Pour l'entraînement à la vapeur, le flux de vapeur d'eau était la seule source de chauffage, traversant la matière première et emportant les molécules volatiles, pour ensuite se recondenser dans le réfrigérant. Pour la distillation à l'eau, l'alimentation en vapeur d'eau permettait de chauffer les 15 L d'eau remplissant la cuve, dans lesquels était immergée la matière première, tout en maintenant constant le volume d'eau interne. En conséquence, un réfrigérant adéquat, capable de refroidir de grandes quantités de vapeur, a dû être construit dans nos laboratoires. Le réfrigérant était constitué d'un fût métallique fermé (68 L) avec entrée d'eau en bas et sortie d'eau en haut, et un serpentín en cuivre à l'intérieur dans lequel passait la vapeur. Cette installation a permis d'augmenter les performances de l'hydrodistillation avec notamment un débit de vapeur quadruplé (de 500 mL/h à 2 L/h) (*schéma présenté au chapitre 5*).

Grâce à la présence d'une sortie de drainage de la cuve, il a été possible de récupérer facilement l'extrait aqueux produit simultanément pendant l'hydrodistillation. Cet extrait a

donc été appelé « extrait drainé » (drained extract). Pendant l'entraînement à la vapeur, il est formé par la condensation de la vapeur d'eau dans la cuve, qui ensuite imbibe la matière première. Lors de la distillation à l'eau, comme la matière première est immergée, l'extrait aqueux est formé tout au long du processus. Les quantités d'huile essentielle obtenues étant encore trop faibles, l'hexane a été utilisée pour récupérer la couche surnageante de l'eau de distillation.

2.2.1.3. Conception du plan d'expérience du procédé intégré

Un plan d'expérience a été conçu pour pouvoir comparer de manière optimale les deux types d'hydrodistillation les plus utilisés dans l'industrie : l'entraînement à la vapeur et la distillation à l'eau. Un schéma du plan d'expérience est présenté dans le chapitre 5.

Les expériences ont donc été effectuées dans le même appareillage, selon les mêmes paramètres fixes (masse de matière première, débit de vapeur, durée d'extraction...). L'analyse des produits récupérés, l'huile essentielle, l'hydrolat et l'extrait aqueux drainé de la cuve ont permis de comparer les deux procédés.

Afin d'évaluer si la matière première a été épuisée de ses molécules hydrosolubles, une extraction à l'eau chaude a été réalisée à partir de l'écorce hydrodistillée. Enfin, la qualité du procédé pour la production d'un extrait aqueux a été comparée à une expérience contrôle d'extraction à l'eau chaude effectuée en parallèle. À chaque étape du procédé, les écorces résiduelles ont été récoltées et testées pour leur pouvoir calorifique.

2.2.2. Optimisation de l'extraction à l'eau chaude

2.2.2.1. L'extraction à l'eau chaude

L'extraction à l'eau chaude a été choisie préférentiellement pour l'écorce d'épinette noire en raison de la qualité de l'extrait obtenu lors de précédentes études (Garcia-Perez et al., 2010; Royer et al., 2013). Solvant vert par excellence, l'eau présente l'avantage d'être non toxique et donc de répondre aux exigences des industries nutraceutiques et alimentaires aux réglementations très strictes.

Les extractions à l'eau chaude ont été effectuées à l'aide d'un montage à reflux classique, composé d'un système de chauffage (chauffe-ballon pour 100 °C ou bain thermostaté pour 80 °C), d'un ballon 250 mL contenant la matière première et l'eau et d'une colonne réfrigérante alimentée en eau de refroidissement.

2.2.2.2. Le plan d'expérience pour l'optimisation de l'extraction

Afin de maximiser l'efficacité d'une optimisation d'extraction et de minimiser le nombre d'extraction, la mise en place d'un dispositif expérimental suivant un modèle statistique est fortement conseillé. Le plan d'expérience pour l'optimisation de l'extraction à l'eau chaude de l'écorce d'épinette noire a été conçu selon un plan factoriel 3×3×2. Trois paramètres et plusieurs niveaux ont été sélectionnés : la durée d'extraction (60; 90; 120 minutes), le ratio écorce/solvant (200; 100; 50 mg/mL) et la température de chauffage (80; 100 °C), (Tableau 2.1) (Vazquez et al., 2001).

Tableau 2.1. Distribution des différents niveaux des trois paramètres du plan factoriel.

Dénomination	Durée (minutes)	Ratio (mg/mL)	Température (°C)
EPN-A	60	200	80
EPN-B	60	200	100
EPN-C	60	100	80
EPN-D	60	100	100
EPN-E	60	50	80
EPN-F	60	50	100
EPN-G	90	200	80
EPN-H	90	200	100
EPN-I	90	100	80
EPN-J	90	100	100
EPN-K	90	50	80
EPN-L	90	50	100
EPN-M	120	200	80
EPN-N	120	200	100
EPN-O	120	100	80
EPN-P	120	100	100
EPN-Q	120	50	80
EPN-R	120	50	100

Le plan factoriel permet de combiner les différents paramètres et de les étudier individuellement grâce à l'utilisation des répétitions cachées dans le traitement statistique.

Les extractions ont été effectuées en duplicata (validé statistiquement par la valeur de l'erreur dans l'ANOVA). Par exemple, il y aura deux extraits «EPN-A», portant les noms de « EPN-A1 » et «EPN-A2».

Les variables choisies pour évaluer l'optimisation de l'extraction sont : le rendement, les teneurs en grandes familles phytochimiques (phénols totaux, proanthocyanidines et sucres totaux), le pouvoir antioxydant (test DPPH) et les concentrations en composés phénoliques de petit poids moléculaire. Les données ont ensuite été traitées selon des analyses statistiques : l'analyse de la variance (ANOVA), l'analyse des contrastes et l'analyse en composantes principales (PCA). Les résultats des tests statistiques ont été évalués pour un seuil de significativité à $\alpha = 5\%$.

2.3. Méthodes d'analyses chimiques

2.3.1. Analyses chimiques des huiles essentielles et hydrolats

Les huiles essentielles, obtenues en très faible quantité, ont été récupérées dans l'hexane. Les composés organiques de l'hydrolat ont été extraits à l'hexane par partition liquide-liquide dans une ampoule à décanter. *Les compositions des huiles essentielles et des hydrolats ont fait l'objet d'un article scientifique présenté dans le chapitre 4. La composition du résinoïde d'écorce d'épinette noire est présentée ici en tant que résultat complémentaire.*

2.3.1.1. Chromatographie en phase gazeuse GC et détection FID

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est une technique de séparation de composés contenus dans un mélange, permettant leur identification et leur quantification. Ils doivent être suffisamment volatils et thermiquement stables. La détection FID (Flame Ionization Detector) mesure la concentration des composés dans un gaz, l'hydrogène. La quantification par FID est plus précise qu'une quantification en mode SCAN par GC-MS.

La séparation a été effectuée sur une colonne Agilent J&W VF-5ms (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) avec une phase stationnaire apolaire (5%-phényl)-méthylpolysiloxane. Afin d'obtenir une bonne définition des pics, une optimisation du programme de température a été effectuée pour obtenir le gradient suivant : 50 °C à 200 °C à 3 °C/min. Le gaz vecteur entraînant les molécules est l'hélium à raison de 1 mL/min et la flamme est composée d'hydrogène (30 mL/min) et d'air (300 mL/min). Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 250 et 285 °C.

La quantification des molécules dans le mélange s'effectue grâce à l'aire sous la courbe de chaque pic obtenu. La taille du pic correspond à la quantité du composé dans le mélange étudié. Ainsi l'aire sous la courbe, rapportée à l'aire totale du chromatogramme donne le pourcentage d'un composé dans le mélange.

2.3.1.2. Méthodes d'identification

Les petits terpènes volatils sont difficiles à identifier car ils possèdent tous sensiblement la même masse moléculaire. Les monoterpènes hydrocarbures par exemple, tous issus de cyclisations et de réarrangement de la même molécule de base, le géranyl diphosphate, ont presque tous la même formule brute et la même masse moléculaire de 136 g/mol. Ceci rend donc complexe leur différenciation. Afin d'identifier les molécules qui composent l'huile essentielle et l'hydrolat de l'écorce d'épinette noire, deux méthodes d'identification sont utilisées : le calcul de l'indice de rétention et l'analyse des spectres de masses. La combinaison des informations de ces deux méthodes, ajoutée à la comparaison avec une molécule standard (lorsque disponible) permet une identification efficace des composés volatils (Zellner et al., 2008).

2.3.1.2.1. GC-MS Chromatographie en phase gazeuse et spectroscopie de masse.

Le couplage de la GC avec un spectromètre de masse permet d'obtenir pour chaque composé un spectre de masse. Celui-ci présente la fragmentation spécifique du composé ainsi que sa masse moléculaire. L'étude des composés volatils en GC-MS étant très développée, de

nombreuses bases de données pour l'analyse de leurs spectres de masse sont disponibles et permettent d'appliquer la déréplication pour l'identification des molécules.

Les analyses GC-MS au laboratoire ont été effectuées sur un appareil Varian Saturn 2200 GC/MS/MS. Les conditions de chromatographie en phase gazeuse étaient les mêmes que celle décrites pour l'analyse FID. La source d'ionisation électronique, permet la fragmentation des molécules par la génération d'ions moléculaires par impact électronique à 70 eV. L'acquisition du signal MS était programmée entre 30 et 600 m/z . Les spectres de masse ainsi obtenus ont été comparés à ceux disponibles dans les bases de données NIST 02, Adams et Essentia disponibles dans le logiciel d'analyse MS Workstation Varian.

2.3.1.2.2. *Indice de rétention*

Considérant la phase mobile (le gaz) comme une constante puisque sa vitesse ne change pas, le calcul de l'indice de rétention se base sur le temps de rétention des molécules sur la phase stationnaire de la colonne. La chromatographie en phase gazeuse ségrègue les molécules en fonction de leur volatilité et de leur interaction avec la phase stationnaire, selon un programme de températures. Ainsi, sur un modèle de colonne donnée (dépendamment de la nature de sa phase stationnaire), leur ordre de sortie sera toujours le même. Basé sur cette supposition, l'utilisation d'un mélange d'alcane saturés de C_7 à C_{30} permet de créer des échelons sur le chromatogramme. Le calcul de l'indice de Kovats Kramer se base sur le temps de rétention de ces échelons pour standardiser les temps de rétention des molécules dans un mélange complexe. Ainsi l'équation suivante (Équation 1) permet de définir un indice de rétention pour chaque molécule. La comparaison de l'indice calculé avec ceux de la littérature pour le même type de colonne est une méthode précise d'identification (Zellner et al., 2008).

$$I^T = 100 \left[z + \frac{t_{Ri}^T - t_{Rz}^T}{t_{R(z+1)}^T - t_{Rz}^T} \right] \quad (\text{Équation 1})$$

I^T : indice de rétention

t_{Ri}^T : temps de rétention du pic du composé étudié;

t_{Rz}^T : temps de rétention du pic de l'alcane à z atomes de carbone qui précède le composé étudié;

$t_{R(z+1)}^T$: temps de rétention du pic de l'alcane à $(z+1)$ atomes de carbone qui suit le composé étudié;

z : nombre de carbone du pic d'un alcane.

2.3.1.2.3. Utilisation des molécules standards

Les molécules standards pures ont été utilisées en GC-FID en tant qu'étalon interne et pour la réalisation d'une courbe étalon d' α -pinène pour une meilleure quantification. En GC-MS, elles ont permis de confirmer l'identification de certaines molécules par comparaison des spectres et en co-élution. Leur temps de rétention ont également été des repères sur le chromatogramme et ont permis la validation des indices de Kovats Kramer. Dix-sept molécules standards ont été utilisées dans cette recherche : α -pinène, β -pinène, limonène, camphre, 4-éthylphénol, bornéol, camphène, sabinène, α -phellandrène, 3-carène, p -cymène, α -terpinéol, verbénone, *cis*-myrtanol, bornyl acétate, β -caryophyllène, et carvone.

2.3.1.3. Confirmation de la composition en terpènes volatils par extraction du résinoïde

Afin de confirmer la composition de l'huile essentielle, une extraction à froid avec de l'hexane a été effectuée sur 200 g d'écorce fraîche (soit 76 g d'écorce sèche), pendant 6h sous agitation. Après filtration, l'hexane a été lentement éliminée à l'évaporateur rotatif en dessous de 40 °C. Le résinoïde brut, d'apparence jaune et d'aspect cireux, a été extrait à hauteur de 1,7 g, soit un rendement de 2,24%. La composition du résinoïde a été élucidée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (Tableau 2.2).

Le résinoïde présente une composition similaire aux huiles essentielles avec notamment une prédominance d' α -pinène (40,8%) et de β -pinène (21,8%). Néanmoins, il contient une proportion plus importante en composés oxygénés (14,6%) que les huiles essentielles (1,1% pour l'entraînement à la vapeur (SD), 6,3% pour la distillation à l'eau (WD)). Lors de la distillation, la majorité des composés oxygénés se retrouve préférentiellement dans l'hydrolat car ils sont plus polaires que les composés hydrocarbures. La partition naturelle des composés qui s'effectue entre la phase polaire (hydrolat) et la phase apolaire (huile essentielle) n'a pas

lieu lors de l'extraction à froid à l'hexane, qui récupère ainsi un peu plus de composés oxygénés. Le résinoïde possède également plus de sesquiterpénoïdes (14,2%) que les huiles essentielles (SD 0,8%; WD 2,9%). Les sesquiterpènes, composés à 15 carbones, sont plus lourds que les monoterpènes. Ils sont ainsi moins volatils, avec des points d'ébullition plus élevés, ce qui affecte leur vaporisation lors de l'hydrodistillation des huiles essentielles (Sell, 2010). Lors d'une extraction à l'hexane, la polarité des composés est privilégiée. Ainsi les sesquiterpènes hydrocarbures, très apolaires, auront une très bonne affinité avec l'hexane.

Tableau 2.2. Composés organiques volatils (COV) du résinoïde d'écorce d'épinette noire.

Composés	RI	COV Résinoïde ^a (%)	Identification ^b
Tricyclène	924	0,3	MS, RI
α -Thujène	926	0,3	MS, RI
α-Pinène	934	40,8	Std, MS, RI
Camphène	951	0,8	Std, MS, RI
β-Pinène	980	21,8	Std, MS, RI
3-Carène	1010	1,9	Std, MS, RI
<i>p</i> -Cymène	1026	0,2	Std, MS, RI
Limonène	1030	1,9	Std, MS, RI
β-Phellandrène	1032	1,8	MS, RI
Terpinolène	1086	trace	MS, RI
<i>p</i> -guaïacol	1087	0,4	RI, MS
<i>exo</i> -Fenchyl alcool	1122	0,3	MS, RI
α -Campholenal	1129	0,3	MS, RI
<i>trans</i> -Pinocarvéol	1144	1,7	MS, RI
Pinocarvone	1165	0,2	MS, RI
Bornéol	1175	1,1	Std, MS, RI
Terpinen-4-ol	1183	0,9	MS, RI
α -Terpinéol	1199	7,3	Std, MS, RI
Verbénone	1212	1,6	Std, MS, RI
Thymol methyl éther	1231	0,4	MS, RI
<i>cis</i> -myrtanol	1268	0,2	RI, MS, Std
4-Ethylguaïacol	1275	0,2	MS, RI
α -Longipinène	1349	0,4	RI, MS
Longicyclène	1399	0,5	MS, RI
Longifolène	1414	6,9	MS, RI
β -Caryophyllène	1423	3,4	Std, MS, RI
α -Humulène	1458	0,7	MS, RI
α -Bisabolène	1475	2,2	RI, MS
Monoterpénoïdes	-	84,3	-
Sesquiterpénoïdes	-	14,2	-
Composés oxygénés	-	14,6	-
Total	-	98,5	-

^a : composés organiques volatils du résinoïde, ^b : Std : Standard; MS : Spectre de Masse; RI : Indice de Retention.

L'extraction du résinoïde à partir de l'écorce de l'épinette noire a permis dans un premier temps de valider la composition des écorces en monoterpénoïdes et sesquiterpénoïdes volatils. En effet, les principales différences entre la composition du résinoïde et celles des huiles essentielles résident principalement dans certaines spécificités physico-chimiques inhérentes aux procédés employés. Étant donné le rendement obtenu, il pourrait être intéressant de poursuivre l'étude du résinoïde d'écorce d'épinette noire en produisant l'absolue (extraction spécifique des composés odorants à l'éthanol). Le résinoïde et l'absolue pourraient constituer des produits de parfumerie au même titre que l'huile essentielle.

2.3.2. Analyses chimiques des extraits aqueux

Les résultats des analyses chimiques des extraits aqueux sont présentés dans les chapitre 5 (pour les extraits issus du procédé intégré) et 6 (pour les extraits issus de l'optimisation de l'extraction à l'eau chaude). Des résultats complémentaires au chapitre 5 sont fournis dans cette section à titre de résultats préliminaires non publiés.

2.3.2.1. Tests colorimétriques

Les tests colorimétriques évaluent les teneurs en famille de composés dans un mélange. Exprimés selon des standards grâce à des courbes de calibration, ils permettent d'avoir un premier aperçu de la composition relative d'un extrait, de faire des screenings et des comparaisons.

2.3.2.1.1. Phénols totaux

La teneur en composés phénoliques a été mesurée par le test de Folin-Ciocalteu, selon une méthode adaptée de St-Pierre et al. (2013). Il s'agit d'une réaction d'oxydation des composés phénoliques par le réactif de Folin-Ciocalteu, constitué d'un mélange d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) et d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$). L'oxydation des phénols entraîne simultanément la réduction du réactif en oxydes de tungstène et de molybdène produisant une coloration bleue mesurable par spectrophotométrie. Le taux de

phénol totaux est exprimé en acide gallique équivalent (mg GAE/g d'extrait sec) à l'aide d'une courbe de calibration d'acide gallique.

2.3.2.1.2. *Tanins condensés (proanthocyanidines totaux)*

L'évaluation de la teneur en tanins s'effectue par la quantification des proanthocyanidines obtenue par le test du butanol-acide chlorhydrique décrit par Porter et al. (1985). L'hydrolyse acide fragmente les oligomères et les polymères de tanins en unités monomériques d'anthocyanes qui produisent une coloration mauve par réaction d'oxydation avec un réactif ferrique. Le taux en proanthocyanidines est déterminé par mesure de l'absorbance des solutions à 550 nm par spectrophotométrie et exprimé en cyanidine équivalent (mg CCE/g d'extrait sec) à l'aide d'une courbe de calibration de chlorure de cyanidine.

2.3.2.1.3. *Sucres totaux*

Les sucres totaux dans les extraits d'écorce d'épinette noire ont été mesurés par une méthode adaptée de la réaction phénol-acide sulfurique (Albalasmeh et al., 2013). Cette réaction est basée sur la déshydratation des sucres par l'acide sulfurique concentré formant des dérivés du furfural. Ces derniers réagissant avec le phénol produisent une coloration mesurable par spectrophotométrie UV-vis. Une courbe de calibration d'un mélange stœchiométrique d'Arabinose-Rhamnose-Galactose-Fructose (ARGF), sucres les plus souvent représentés après hydrolyse acide des oligosaccharides d'extraits végétaux (Chow & Landhäusser, 2004) a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires afin d'exprimer le taux de sucres en mg ARGF/g d'extrait sec.

2.3.2.2. Test de l'azote total

Le test de l'azote total permet de détecter la présence de composés azotés comme les protéines dans un échantillon. Cette mesure est effectuée par un analyseur d'azote (Perkin Elmer N2410 Series II (Perkin Elmer Instrument, USA)) selon la méthode de combustion de Dumas. Il s'agit d'une combustion totale de l'échantillon sous oxygène, produisant différents gaz qui sont ensuite réduits puis séchés; les gaz non dosés sont piégés par des réactifs adaptés.

L'azote libre est détecté par un catharomètre, et est exprimé en % de l'extrait. Ce taux d'azote peut être converti en taux de protéine grâce à l'équation suivante (Équation 2) :

$$\% \text{ Protéine} = \% \text{ Azote} \times \text{Facteur de conversion} \quad (\text{Équation 2})$$

Le facteur de conversion de 6,25 considère que toutes les protéines contiennent 16 % d'azote. Cependant, l'origine de l'azote dans un échantillon peut être autre que protéique. Dans le genre *Picea* par exemple, des alcaloïdes (composés azotés) ont déjà été rapportés (Schneider et al., 1991). Les taux d'azote étant très bas dans l'extrait aqueux d'écorce d'épinette noire ($0,24 \pm 0,04\%$), les recherches n'ont pas été poursuivies pour déterminer s'il s'agit de protéines ou d'alcaloïdes.

2.3.2.3. Détermination de la composition chimique

2.3.2.3.1. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) analytique

La chromatographie liquide de haute performance permet de séparer les composés d'un mélange selon un gradient de solvant. Les composés forment des pics sur un chromatogramme selon leur absorbance en ultraviolet. L'HPLC analytique est un instrument de précision capable d'analyser de petites quantités d'échantillon pour en connaître le profil. Les analyses ont été réalisées sur un appareil Agilent Technologies Series 1100 équipé d'une pompe quaternaire, d'un détecteur DAD (diode array detector) et d'une colonne en phase inverse Zorbax SB-C18 ($4,6 \times 250$ mm, $5 \mu\text{m}$). Le gradient de solvant a été développé et optimisé en laboratoire avec deux solvants: (A) eau millipore contenant 1% (v/v) d'acide formique et (B) acétonitrile, selon un gradient optimisé comme suit : 5-15% (B) de 0 à 10 min, 15% (B) pendant 5 min, 15-30% (B) de 15 à 20 min, 30% (B) pendant 5 min, 30-40% (B) 5 min et 40% (B) 5 min, selon un flux de solvant à 0,7 mL/min. La colonne était ensuite équilibrée pendant 10 min pour retrouver les conditions initiales. Les extraits d'écorce d'épinette noire de concentration 1 mg/mL ont été injectés à un volume de 10 μL . La détection UV a été réalisée selon trois longueurs d'onde : 280, 320 et 340 nm. Huit composés phénoliques de faibles poids moléculaires absorbant dans les longueurs d'onde suivantes ont été sélectionnés pour purification.

2.3.2.3.2. LC-MS

La LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) consiste en un couplage entre la chromatographie en phase liquide et une détection par un spectromètre de masse. Les analyses permettent en plus d'une séparation optimale des composés, d'enregistrer leurs spectres de masses. L'appareil utilisé est un Agilent Technologies 6210 Time-of-Flight (TOF), équipé d'une source d'ionisation electrospray en mode positif (ESI+). Les spectres de masse enregistrés ont été traités par le logiciel Agilent MassHunter Qualitative Analysis. Les masses moléculaires de haute résolution des composés obtenues grâce aux spectres de masse ont permis d'effectuer de la déréplication. Cette méthode consiste à générer des formules brutes hypothétiques précises à partir de la valeur de la masse. Ces informations constituent des indices précieux dans l'identification des composés. Certains fragments obtenus dans les spectres de masse peuvent révéler également la présence d'un sucre; dans ce cas, un pic correspondant à la molécule aglycone (partir non-glycosidique d'un hétéroside) est présent sur le spectre.

2.3.2.3.3. Purification des composés

Un extrait est un mélange de composés. Afin d'isoler ces composés, plusieurs étapes de purification sont nécessaires. Tout d'abord, l'extrait brut a été purifié sur une colonne ouverte de gel de silice (particules d'hydroxyde de silicium entre 63 et 200 μm) avec un gradient de solvant de dichlorométhane et méthanol. Les molécules sont ainsi séparées selon leurs affinités respectives avec la silice et l'éluant (solvant). Le gradient allant de 10% méthanol à 100% méthanol a permis de diviser l'extrait brut en huit fractions différentes, contenant des molécules des plus apolaires au plus polaires. Les fractions Si-1, Si-2, Si-4 et Si-5, présentant une sélection optimale de certains des composés à isoler, ont été purifiées à l'aide d'une HPLC semi-préparative, pour obtenir les composés purs 3, 4, 5, 7 et 8 (Figure 2.1). Les chromatographies semi-préparative ont été effectuées sur un instrument Agilent Technologies 1260 Infinity équipé d'une colonne Zorbax SB-C18 column (21,2 \times 250 mm, 7 μm), d'un détecteur DAD et d'un système de collection des fractions. Le gradient de solvant eau/méthanol, selon un flux de 10 mL/min a été adapté pour la purification de chaque composé selon leur polarité. Afin d'obtenir les 3 molécules ciblées restantes, la fraction Si-6 a été fractionnée sur une colonne ouverte de Séphadex. La chromatographie sur gel de

Séphadex (gel de dextrane) est une chromatographie d'exclusion : les plus grosses molécules sont éluées en premier. L'application d'un gradient eau/méthanol 3:1 à 0:1 permet d'ajouter une affinité de polarité nécessaire à la purification d'une fraction aux molécules trop semblables. Les fractions 6.1 et 6.2 ont été purifiées en HPLC semi-preparative individuellement pour donner des quantités suffisantes des composés 1 et 2, et la fraction 6.8 pour la molécule 6 (Figure 2.1).

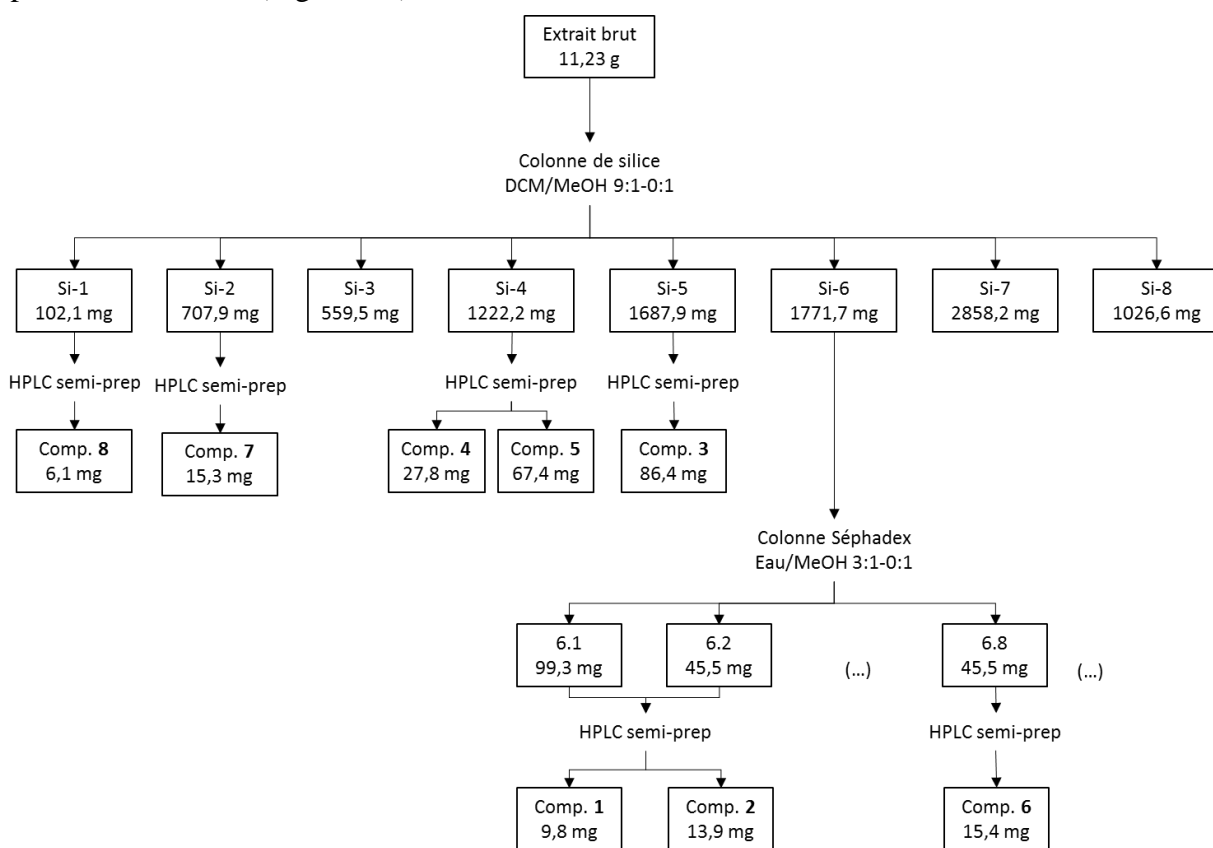


Figure 2.1. Schéma des étapes de séparation et de purification de l'extrait aqueux brut d'épinette noire.

2.3.2.3.4. Analyses de résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est un outil puissant en chimie, permettant d'obtenir des données très précises sur la structure d'une molécule. Cette technique utilise les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques comme le proton ^1H ou le carbone ^{13}C . Les spectres unidimensionnels (^1H et ^{13}C) donnent des informations sur les atomes de la molécule mais également sur leurs environnements atomiques. En effet, la position des pics sur le spectre (blindés ou déblindés) ainsi que leur multiplicité et leur

constante de couplage (pour le spectre proton) permettent notamment de suggérer la présence d'autres atomes environnants qui influencent (comme des oxygènes par exemple).

La RMN bidimensionnelle, permet, quant à elle, de voir les corrélations entre les atomes. Plusieurs types de RMN 2D sont disponibles et complémentaires pour l'analyse de la structure d'une molécule. La RMN 2D homonucléaire COSY (CORrelation SpectroscopY) permet de voir les corrélations directes (une ou deux liaisons de séparation) entre les protons, la RMN 2D HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) détecte les corrélations directes entre les carbones et les protons, la RMN 2D HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) renseigne sur les corrélations entre les carbones et les protons séparés par deux, trois voire quatre liaisons (dans le cas des systèmes conjugués). Les RMN NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) et ROESY (Rotating frame nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) révèlent les couplages entre les protons dans l'espace.

Effectuée sur un instrument Agilent 400-MR DD2, la spectroscopie RMN permet, grâce aux différents spectres qu'elle produit, de déterminer la structure exacte d'une molécule.

2.3.2.4. Quantification

La quantification des huit molécules ciblées dans l'extrait aqueux brut s'effectue par HPLC analytique à l'aide de courbes étalons. Pour chaque molécule, une courbe étalon est réalisée selon une gamme de concentrations encadrant la concentration réelle du composé dans l'extrait. Les aires sous la courbe pour chacun des huit composés présents sur le chromatogramme de l'extrait brut sont rapportées à leurs courbes étalons respectives. Ainsi, il est possible de déterminer la concentration de chaque molécule dans l'extrait.

2.3.2.5. Analyse de la composition des extraits aqueux obtenus durant le procédé intégré

Ces résultats sont des résultats complémentaires, venant enrichir la recherche sur le procédé intégré (Chapitre 5). Ils ont pu être obtenus grâce à la contribution des résultats du Chapitre 6. Cette analyse des compositions des extraits aqueux issus du procédé intégré a pour objectif de répondre à l'hypothèse selon laquelle le procédé intégré et l'extraction classique à l'eau chaude produisent des extraits similaires en composition.

Les extraits SD-DE, WD-DE, SD-HWE, WD-HWE et HWE-C ont été analysés par HPLC et les composés **1** à **8** ont été identifiés par comparaison des temps de rétention et des spectres UV (Figure 2.2). Les huit composés ont ensuite été quantifiés grâce aux courbes étalons décrites au chapitre 6.

Les résultats préliminaires obtenus permettent d'avoir un premier aperçu de la composition des extraits aqueux issus du procédé intégré. D'un point de vue qualitatif, les compositions des extraits sont relativement similaires, à l'exception du composé **3** (*trans*-astringine), qui n'est retrouvé dans aucun des extraits issus du procédé intégré (Figure 2.2). Cette absence est assez surprenante, car il s'agit d'un composé commun des extraits d'écorces du genre *Picea* (Aritomi & Donnelly, 1976; Gromova et al., 1974; Latva-Mäenpää et al., 2013; Manners & Swan, 1971; Mannila & Talvitie, 1992; Solhaug, 1990). Le composé **2** n'a pas été détecté dans l'extrait WD-HWE, néanmoins la présence des sept molécules dans les autres extraits a été validée. D'autres pics sont présents sur certains chromatogrammes, dont ceux sortant avant ou après le composé **4**, ainsi qu'un pic à 33-35 min (selon les chromatogrammes) (Figure 2.2). Cependant, le maintien du même profil de composés dans les différents extraits permet de conclure à la validité du procédé intégré pour la production d'extraits aqueux riches en polyphénols.

D'un point de vue quantitatif, les extraits issus du procédé intégré sont comparés à l'extrait contrôle. Globalement, les composés **1**, **2**, **4** et **5** sont représentés en plus petites quantités que dans le contrôle (Tableau 2.3). Cette différence est particulièrement marquée pour le composé **5** dont la proportion diminue pratiquement d'un facteur 10. Ces composés sont des glycosides (voir chapitre 6), ainsi, la diminution de leurs proportions dans les extraits du procédé intégré pourrait s'expliquer par une hydrolyse partielle des sucres dus à une exposition prolongée à des hautes températures. Il serait alors possible de détecter leurs aglycones. Cette hypothèse se vérifie en partie par l'augmentation des proportions des composés **7** et **8**, étant respectivement les aglycones des composés **4** et **5**. De plus amples investigations permettraient éventuellement de détecter la présence des aglycones des composés **1**, **2** et **3** (à savoir l'acide coumarique, l'acide férulique et le picéatannol – voir chapitre 6).

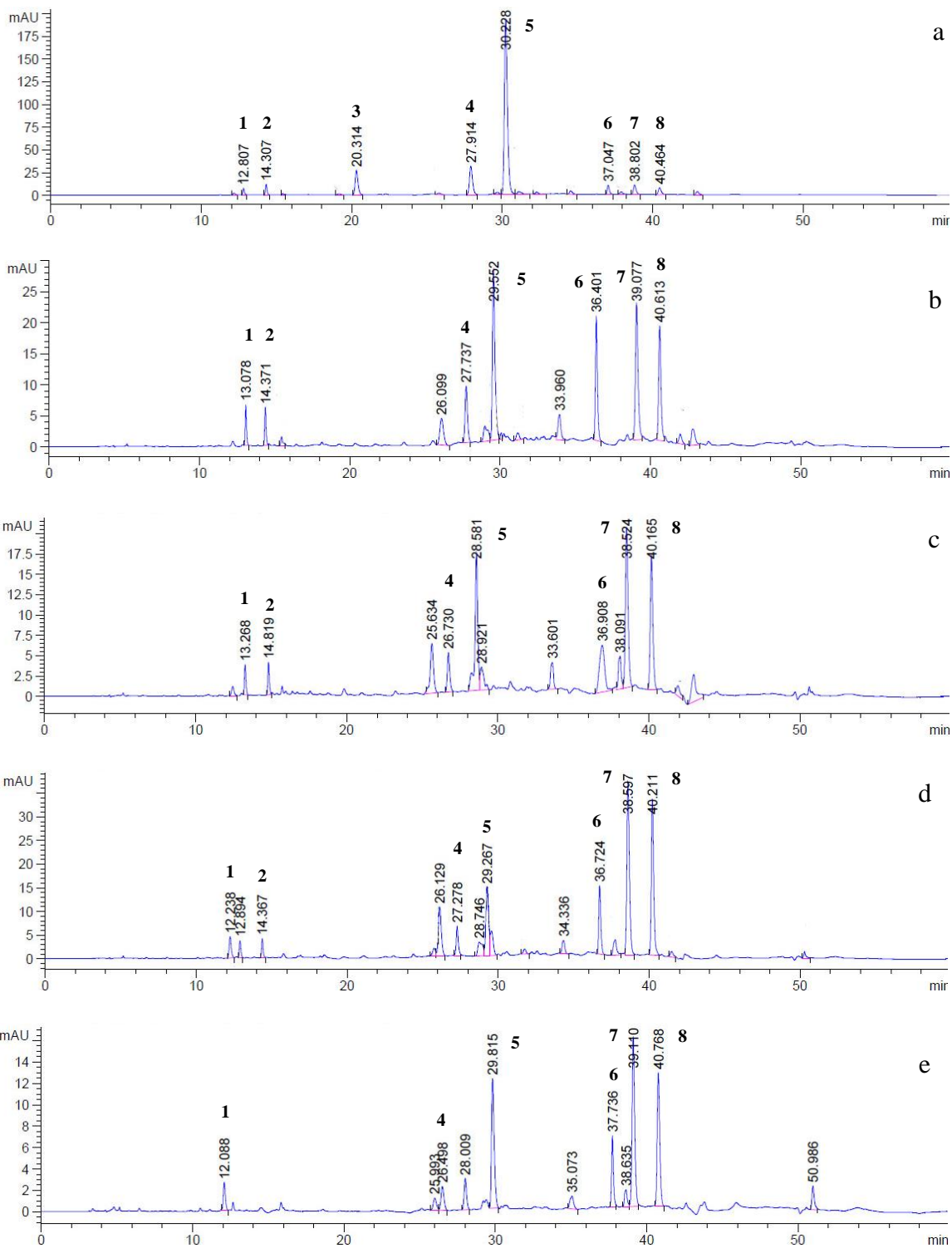


Figure 2.2. Chromatogrammes à 320 nm de l'extrait contrôle HWE-C (a) et des extraits issus du procédé intégré SD-DE (b), SD-HWE (c), WD-DE (d), WD-HWE (e) avec mise en évidence des huit composés identifiés (présentés dans le chapitre 6).

Tableau 2.3. Les huit molécules identifiées dans l'extrait aqueux d'écorce d'épinette noire quantifiées dans les extraits issus du procédé intégré. Les quantités sont exprimées en g/100 g d'extrait sec.

	Quantités des composés identifiés (g/100 g d'extrait sec)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
SD-DE	0,16	0,69	n.d.	1,86	2,00	4,89	0,34	3,00
SD-HWE	0,09	0,59	n.d.	1,72	1,58	4,47	0,29	2,97
WD-DE	0,08	0,60	n.d.	1,75	1,38	4,40	0,55	3,76
WD-HWE	0,07	n.d.	n.d.	1,65	1,41	3,68	0,22	2,73
HWE-C	0,21	0,98	3,49	2,90	10,22	4,07	0,13	2,50

Les composés **1** à **8** sont présentés dans le chapitre 6. SD-DE : extrait vidangé issu de l'entraînement à la vapeur; WD-DE : extrait vidangé issu de la distillation à l'eau; SD-HWE : extrait à l'eau chaude issu d'une extraction à l'eau chaude à partir des écorces entraînées à la vapeur; WD-HWE : extrait à l'eau chaude issu d'une extraction à l'eau chaude à partir des écorces distillées à l'eau; HWE-C : extrait à l'eau chaude, contrôle; n.d. : non détecté.

Si l'on s'intéresse plus en détails aux différences entre les extraits issus du procédé intégré, on remarque que les extraits SD-HWE et WD-HWE ont des proportions en composés moins importantes que leurs extraits drainés respectifs (SD-DE et WD-DE) (Tableau 2.3). Il semble ainsi peu pertinent d'effectuer une deuxième extraction avec les écorces résiduelles, celles-ci étant déjà en partie épuisées de leurs molécules. La comparaison de la composition des deux extraits drainés montre une tendance : SD-DE possèdent des quantités plus importantes de composés glycosylés (**1**, **2**, **4** et **5**) et WD-DE possèdent des quantités plus importantes d'aglycones (**7** et **8**).

Cette analyse préliminaire des compositions chimiques des extraits issus du procédé intégré permet d'apporter des premiers éléments de réponses quant à la viabilité du procédé intégré pour la production d'extraits aqueux enrichis en polyphénols. Les compositions de SD-DE, SD-HWE et WD-DE ont été rapportées semblables à l'extrait contrôle d'un point de vue qualitatif, à l'exception du composé **3**. Les quantités de composés varient entre l'extrait contrôle et les extraits du procédé intégré, notamment pour le composé **5**, mais les proportions restent dans les mêmes ordres de grandeur. Afin de confirmer ses résultats préliminaires, il semble pertinent de renouveler les expériences du procédé intégré afin d'assurer une reproductibilité dans la production des extraits (rendements et compositions

chimiques). La répétition des expériences pourrait ainsi permettre un traitement statistique adéquat. De plus, une identification plus précise des composés est également requise, avec des données de masses et/ou des co-élutions avec des composés purs en HPLC. Les résultats présentés ici ouvrent une nouvelle voie de recherche dans la poursuite des investigations sur le procédé d'extraction complète de l'écorce d'épinette noire.

2.3.3. Mesure de la capacité antioxydante

La capacité antioxydante d'extraits naturels peut être mesurée *in vitro* grâce à des tests colorimétriques d'évaluation rapide. Les extraits d'épinette noire ont déjà démontré une capacité antioxydante selon plusieurs méthodes : anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle...etc (Garcia-Perez et al. 2010). Ainsi, afin de comparer la capacité antioxydante des extraits entre eux, deux tests antioxydants, mettant en jeu des mécanismes d'action différents, ont été choisis parmi les nombreuses méthodes disponibles : le test DPPH et le test ORAC.

2.3.3.1. DPPH

Le test du radical DPPH implique une réaction de type SET (Single Electron Transfert), mesurant la capacité de piégeage des radicaux libres par un extrait antioxydant. Ce test est une réaction non compétitive entre le radical stable DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et un antioxydant, impliquant le transfert rapide d'un électron, puis la donation plus lente d'un hydrogène (MacDonald-Wicks et al., 2006) (Équation 3).



En présence d'un antioxydant, le radical DPPH de couleur violette est réduit, provoquant une décoloration de la mixture en jaune, détectable par spectrophotométrie. Le pourcentage d'inhibition du DPPH est calculé selon l'équation 4, où A_0 est l'absorbance du blanc, A_1 l'absorbance du mélange extrait et DPPH :

$$I (\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100 \quad (\text{Équation 4})$$

Le pourcentage d'inhibition est ensuite exprimé en Trolox équivalent (mg TE/g d'extrait sec) à l'aide d'une courbe de calibration de Trolox.

2.3.3.2. ORAC

Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) est une réaction compétitive impliquant le mécanisme de transfert d'un atome d'hydrogène (HAT). Il mesure la cinétique de dégradation oxydative d'une sonde moléculaire fluorescente (la fluorescéine) en présence d'un générateur de radicaux libres AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride). L'ajout d'un antioxydant entre en compétition avec la fluorescéine pour l'attaque des radicaux libres et ainsi diminue la perte de fluorescence. La fluorescence est enregistrée 35 fois pendant 120 minutes d'analyse selon les paramètres suivants : longueur d'onde d'émission de 520 nm et d'excitation à 485 nm. La valeur de l'ORAC est exprimée en micromoles de Trolox Equivalent ($\mu\text{mol TE/g}$ d'extrait sec) à l'aide d'une courbe de calibration de Trolox.

2.3.4. Pouvoir calorifique supérieur

Le pouvoir calorifique supérieur est une mesure qui permet d'évaluer la qualité d'un matériau combustible pour la production d'énergie. Il détermine la quantité d'énergie libérée sous forme de chaleur par unité de masse du combustible.

Dans les scieries, l'écorce brute est communément brûlée pour générer de l'énergie ou du chauffage. Dans le cadre de l'étude sur la valorisation complète de l'écorce, il semblait pertinent de déterminer si la qualité de l'écorce pour la combustion pouvait être altérée par les procédés d'extraction (hydrodistillation et extraction à l'eau chaude).

Pour ce faire, six échantillons différents d'écorce d'épinette noire ont été testés en triplicata: un échantillon d'écorce brute (Raw-b) et cinq d'écorces traitées (entraînées à la vapeur (SD-b), entraînées à la vapeur et extraites à l'eau (SD-HWE-b), distillées à l'eau (WD-b), distillées à l'eau et extraites à l'eau (WD-HWE-d) et extraites à l'eau (HWE-b)).

La réaction de combustion complète des échantillons a été réalisée dans une enceinte à volume constant par le dioxygène. Cette mesure a été effectuée par un calorimètre Parr 6400 Automated Isoperibol Calorimeter, Parr Instrument Company, étalonné avec un standard d'acide benzoïque (chaleur de combustion connue; 26,454 MJ/kg).

Chapitre 3 Les résines et huiles essentielles de conifères : composition chimique et applications

Conifer Resins and Essential Oils: Chemical Composition and Applications

Nellie Francezon et Tatjana Stevanovic

Chapitre pour le livre en préparation *Chemistry of lignocellulosics : current trends*, Taylor & Francis.

Résumé

Connues depuis l'antiquité et décrites dans de nombreuses médecines traditionnelles, les résines et huiles essentielles de conifères sont des trésors de la forêt. Constitués de terpénoïdes, une des plus grandes familles de molécules naturelles, ces produits naturels possèdent des propriétés remarquables en tant que matériaux, principes odorants ou encore ingrédients thérapeutiques.

Tout en abordant les sujets de la chimie et de la botanique, ce chapitre vise à mettre en lumière les produits issus des conifères en traitant de leur diversité, de leur singularité et de la large gamme de leurs applications passées et présentes. De la production de composés chimiques, à l'utilisation des résines en art et en archéologie, en passant par les parfums à base d'huiles essentielles de conifères, cet essai retrace autant leurs usages industriels méconnus que les récentes recherches scientifiques sur les propriétés médicinales de leurs constituants.

Mots clés : oléorésine, résine, huile essentielle, térébenthine, conifère, terpène, hydrodistillation, activité thérapeutique, parfumerie, archéologie, art.

Abstract

Known since ancient times and described in many traditional medicines, conifers resins and essential oils are forest's treasures. Composed of terpenoids, one of the largest families of natural molecules, these natural products possess remarkable properties as materials, odorous principles or even therapeutic ingredients.

While discussing the topics of chemistry and botany, this chapter aims to highlight coniferous products by discussing their diversity, their singularity and the wide range of their past and present applications. From the production of chemical compounds, to the use of resins in art and archeology, by way of perfumes based on essential oils of conifers, this essay traces as much their unknown industrial uses as the recent scientific researches on the medicinal properties of their constituents.

Keywords: oleoresin, resin, essential oil, turpentine, conifer, terpene, hydrodistillation, therapeutic activity, perfumery, archeology, art.

3.1. Introduction

Back in ancient time, resins from trees were precious materials. In the Bible, fragrant frankincense and myrrh were described alongside with gold as gifts for the birth of Christ. Resins also appeared to be the first raw material associated with distillation and essential oils production. Famous historians such as Herodotus (484-425 B.C.), Dioscorides (author of “*De Materia Medica*”) and Pliny (1st century A.C.), yet mentioned the existence of turpentine oil from the distillation of pine resins. Interestingly, the word “terpene”, representing the most characteristic group of essential oil components, comes from the German “*Terpen*” which means turpentine (Urdang, 1952). This chapter focuses on conifer resins and essential oils from temperate zone and aims to highlight those little known natural products putting forward their diversity, their singularity and the wide range of their past and present applications.

3.2. Oleoresin from conifers of temperate zone

Conifer genera from northern hemisphere forests are famous for the production of resins rich in terpenoids. The resin is composed of a volatile part (mainly monoterpenes, sesquiterpenes and their oxygenated derivatives) upon evaporation of which remains a solid residue, the rosin, constituted of heavier diterpenes and their derivatives. Highly volatile, monoterpenes are the fragrant principles of oleoresin. They can be captured by steam during the hydrodistillation process to produce essential oils. Among conifer species, pines, larches and spruces from *Pinus*, *Larix* and *Picea* genera are of particular interest as they have specific anatomical features: resin canals. Pines exhibit the larger resin ducts, which are tapped in order to collect large quantities of resins for turpentine production. Firs (genus *Abies*) belonging to the same Pinaceae family as pines, larches and spruces, are also of interest as they similarly produce resin stored in specialized blister cells in their bark (Teranishi et al., 1993). Likewise, some members of Cupressaceae family produce terpenic resins with technological and biological properties, with a long history of various applications. Therefore, we shall limit our discussions here to those two families in order to highlight the most interesting properties and uses of the common European and North American conifers.

3.2.1. Resins from Pinaceae and Cupressaceae families

As mentioned, resins are composed of diterpenes, which are mainly represented by resin acids, but hydrocarbon analogs along with their alcohol and aldehyde derivatives are also often identified in conifer resins. The resin acids belonging to abietadiene derivatives, are based on tricyclic system related to phenantrene skeleton, but containing just two conjugated double bonds. The examples are laevopimaric, palustric, neoabietic and abietic acids, presented in figure 3.1. The dehydroabietic acid with an aromatic ring, is also present in minor quantities, while it is usually generated in higher quantities by oxidative transformation of resins (exposure to air, aging). The presence of higher quantities of dehydroabietic acid in a given resin sample may indicate to its exposure to oxidative agents. Another oxidative product of abietadiene type resin acids is the 7-oxo-dehydroabietic acid, which becomes particularly important as transformation product from resins originally rich in abietadiene type acids (Figure 3.1).

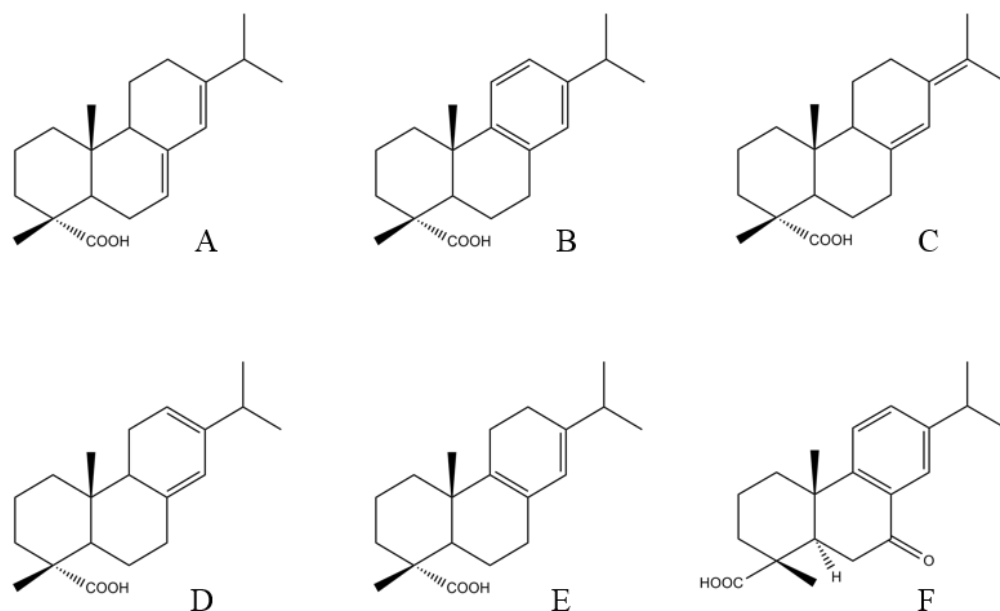


Figure 3.1. Abietadiene type resins; A) Abietic acid, B) Dehydroabietic acid, C) Neoabietic acid, D) Levopimaric acid, E) Palustric acid, F) 7-oxo-dehydroabietic acid.

The pimaradiene type resin acids (Figure 3.2) are based on the same tricyclic skeleton, but have a vinyl and methyl group at C-7 instead of isopropyl and just one double bond in the

cyclic system (Figure 3.3) (which is never conjugated, by difference from the abietane type resin acids). The examples of pimaradiene skeleton based resin acids are isopimaric, sandaracopimaric and pimaric acids (Figure 3.2), which are present in variable quantities depending on plant sources.

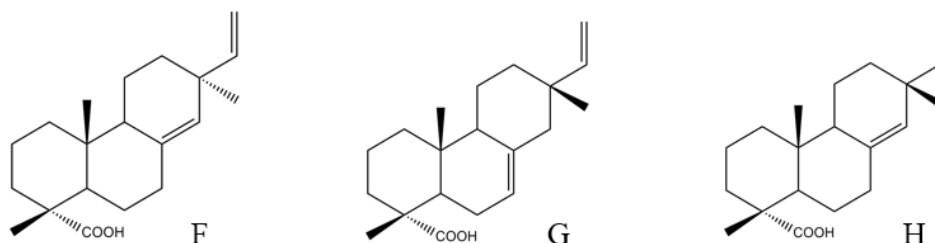


Figure 3.2. Pimaradiene type resin acids; F) Pimaric acid, G) Isopimaric acid, H) Sandaracopimaric acid.

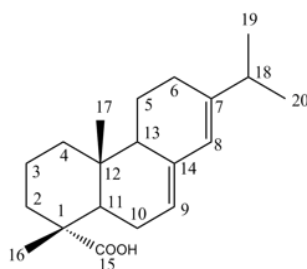


Figure 3.3. Example of numbering of the tricyclic diterpene skeleton.

It is interesting to discuss the chemical composition of fir resins from two firs, that from Europe, *Abies alba*, a source of resin which has traditionally been known as Strasbourg turpentine with that from balsam fir, *Abies balsamea*, a source of Canada balsam. The two resins have very similar chemical compositions, being constituted of neutral abienol in important proportion (42% of *A. alba* and 27% of *A. balsamea* resin), along with sandaracopimaric and isopimaric acids with pimaradiene skeleton and laevopimaric, abietic, dehydroabietic and neoabietic acids with abietane skeleton. While Canada balsam contains also about 6% of aldehyde analogs of the mentioned acids, those are present only in trace amounts in Strasbourg turpentine (Mills & White, 1977), which could help distinguishing between them.

The resin obtained by tapping varying larches species (*Larix* spp.) yield resins rich in abietadiene and pimaradiene resin acids, but also a labdane type diterpenes among which manool appears to be present in larches of all origins. European larch *Larix decidua* has been used in the past under the name of Venice turpentine and has unique constituents, specific to this species, larixol along with its acetate (Figure 3.4), the latter making 30% of Venice turpentine (Mills & White, 1977). Back in the time, the term “turpentine” designated the volatile oil from resin as much as the resin itself. More recently, larixol and its derivative were identified in important quantities in a hybrid Japanese larch *Larix gmelini* var. *japonica* (Sato et al., 2009).

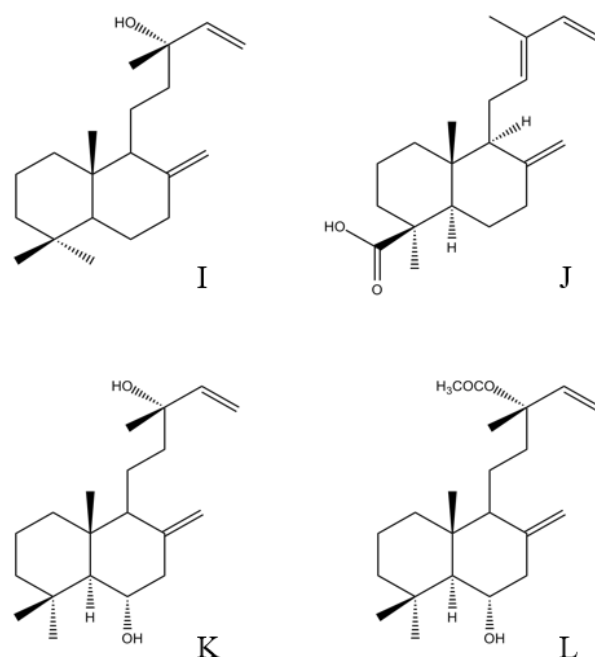


Figure 3.4. Labdane type diterpenes from larches and Cupressaceae family resins; I) 13-epi-manool, J) Communic acid, K) Larixol; L) Larixol acetate.

Yet another important type of conifer resin constituents are those based on labdane bicyclic system, such as found in communic acids, very common constituents of Cupressaceae family (Barrero et al., 2012) and notably of that from Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens*). Containing a conjugated system of double bonds external to bicyclic system, communic acid and similar derivatives, are prone to rapid polymerization upon air exposure (Kononenko et al., 2016).

Speaking of Cupressaceae, it is interesting to mention that Northern white cedar *Thuja occidentalis* bark was also determined to have unusual labdane type diterpenes (Yang et al., 2014).

3.2.2. Essential oils from Pinaceae and Cupressaceae families

3.2.2.1. Essential oils from resin: turpentine oils

Conifer oleoresin is composed of 10 to 20% of volatile oil which acts as a solvent of the solid part rosin. The oil, also called gum spirit turpentine, is extracted by hydrodistillation of the oleoresin collected from tapping of trees, principally pines species. Turpentine oils yields are usually very high: between 10 to 30 % of the resin, depending the pine species. Turpentine oils obtained from different raw materials are available, such as wood turpentine distilled from wood chips, sulfate and sulfite turpentines (by-products of the kraft and sulfite pulping processes) and the destructively distilled wood turpentine obtained from dry distillation of resin rich pine wood (Goldblatt, 1952). Only turpentine oil from living trees tapped oleoresins will be discussed here. We shall precise that the term “turpentine” was also used to name the whole resin, back in time. Turpentine oils presented here are the volatile part of resin only.

Almost exclusively composed of hydrocarbon monoterpenes such as α -pinene, β -pinene, limonene, 3-carene, camphene (Figure 3.5), turpentine oils possess the particularity of containing one major compound reaching up to 90% of their whole composition. This relative purity is advantageous in the perspective of isolating one targeted compound. For example, maritime pine *Pinus pinaster* and black pine *Pinus nigra* turpentines are composed of more than 90% of α -pinene (Mirov, 1948). In the same range, *Pinus strobus* and *Pinus edulis* turpentine oils can contain up to 80% of α -pinene. Longleaf pine (*Pinus palustris*) or slash pine (*Pinus caribaea*) turpentines, the most produced essential oils in the United States during the XXI century are mixtures of α - and β -pinenes up to 90% (Goldblatt, 1952). Known as “American turpentines”, they were largely used in naval stores for the maintenance of wooden naval ships. Even if pinene isomers are widely represented in conifers and are most of the time the main components of turpentine oils, some pine species turpentines, such as Jeffrey pine (*P. jeffreyi*), gray pine (*P. sabiniana*) and Torrey pine (*P. torreyana*) are devoid of pinenes (Mirov, 1948). Major compounds of Jeffrey pine and gray pine turpentines are not

terpenes but heptane, a very flammable paraffin hydrocarbon naturally present in gasoline, which can reach up to 90% of their turpentine composition. In these particular cases of native western North American species, short-chain alkanes make up 95 to 99% of the turpentine composition. In the late XIX century, the discovery of heptane in Jeffrey pine turpentine was quite spectacular. The first batch processed in common distillation still destroyed the plant in a dramatic explosion (Mirov, 1946).

Limonene, a hydrocarbon monoterpene, is also a major compound of turpentine oils (Figure 3.5). Indeed, Torrey pine and stone pine (*P. pinea*) turpentine oils are composed of 75% limonene, but the highest rate is found in pond pine (*P. serotina*) (90% of the whole composition) (Mirov, 1948). However, levorotary *l*-limonene (or (-)-limonene) must be distinguished from its enantiomer, the dextrorotary *d*-limonene ((+)-limonene). The former, found in conifers, smells terpenic, piney, herbal and peppery and the latter, represented in the citrus family has a sweet citrusy scent. Another monoterpene, the very unstable β -phellandrene, is the major compound of turpentine from lodgepole pine (*P. contorta*). This turpentine has to be distilled at reduced pressure in order to avoid the polymerization of β -phellandrene into a sticky substance (Mirov, 1946).

Because of its high content of a limited number of compounds, turpentine is currently regarded as a raw material for the chemical industry. It provides precursor molecules for the production of plastics, adhesives, paints, flavors and fragrances, cosmetics, and pharmaceuticals. Pinenes are by far the most important of them. α -pinene is a starting molecule in the synthesis of a number of molecules, among which borneol, camphor and terpineols. For example, α -terpineol which is lilac scented and very used as a fragrance material, is obtained by hydration of α -pinene. The isomers α - and β -pinene can be transformed into limonene, which is widely used for perfuming household products. They are also the starting material for producing linalool, sweet flowery scented compound. Most perfumery-grade synthetic linalool is derived from pinenes, but linalool is also an intermediate in the manufacture of artificial vitamin E.

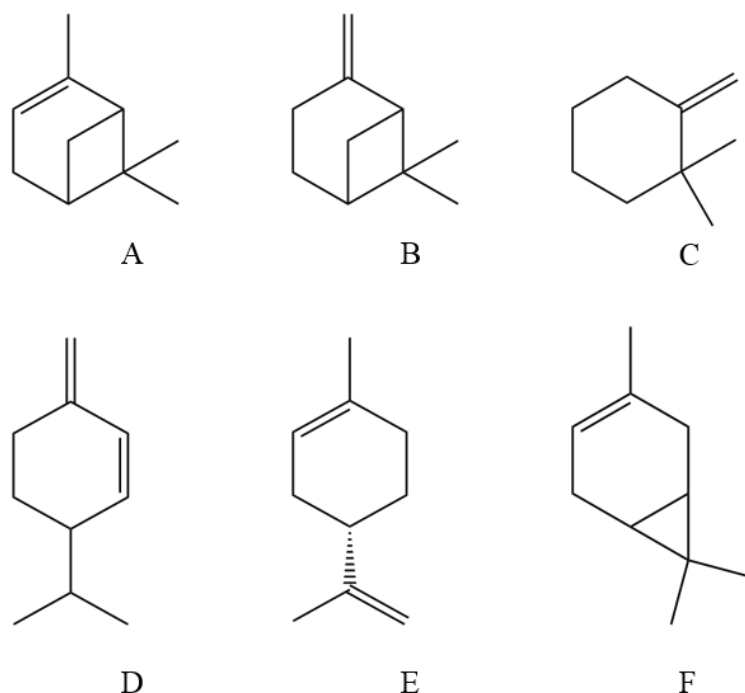


Figure 3.5. Principal components of turpentine oils; A) α -Pinene, B) β -Pinene, C) Camphene, D) β -Phellandrene, E) (-)-Limonene, F) 3-Carene.

3.2.2.2. Essential oils from needles.

Most of conifer essential oils available on the market are produced from needles. Huge amount of foliage biomass is generated by the timber industry, representing around 13% of a tree's volume (Desrochers, 2011). Far less productive than resin turpentine, needles yield only 0.4 to 1% of essential oil (Guenther, 1952) and they are far more complex in composition, as they contain more compounds than turpentine oils and particularly important amount of oxygenated terpenoids. Bornyl acetate, camphor, terpinen-4-ol and α -terpineol (Figure 3.6) are common oxygenated monoterpenoids found in *Pinus*, *Picea* and *Abies* species needle essential oils (Surburg & Panten, 2006) (Figure 3.6). Indeed, black spruce (*Picea mariana*) and botanically related red spruce (*Picea rubens*) foliage essential oils contain 35 to 50% of bornyl acetate (Garneau et al., 2012; Von Rudloff, 1967; Von Rudloff, 1975). White spruce (*Picea glauca*) and Engelmann spruce (*Picea engelmannii*) essential oils contain only 5-20% of bornyl acetate, having camphor as major compound (Rudloff, 1975). The close chemical structures of camphor and bornyl acetate and their occurrence in

Picea spp. indicate that their biosynthesis contains a common intermediate, borneol, which by oxidation yields camphor and by esterification bornyl acetate (Figure 3.6) (Sell, 2010). Bornyl acetate is also a common constituent of essential oils from foliage of *Abies* species, especially of Siberian fir (*Abies sibirica*) and balsam fir (*Abies balsamea*) (Orav et al., 1995) and one pine species essential oil, that of Jack pine (*Pinus banksiana*). Otherwise, monoterpenes such as α -pinene, β -pinene, myrcene, camphene, limonene and β -phellandrene (Figure 3.5) are common constituents of essential oils from Pinaceae species foliage. As for Cupressaceae family, common juniper (*Juniperus communis*) and cypress (*Cupressus sempervirens*) leaf oils are dominated by α -pinene (around 90% for juniper and 40% for cypress) (Banthorpe et al., 1973; Selim et al., 2014). But the most interesting species in this family is undoubtedly *Thuja*. Foliage essential oils from western red cedar (*Thuja plicata*) and eastern white cedar (*Thuja occidentalis*) both originating from North America, contain high levels of thujone (Figure 3.6), a notorious ketone named after its discovery in thuja oil by Wallach in 1902. Western red cedar essential oil is indeed composed of around 50% of thujone isomers (α - and β -) while that of white cedar can contain up to 90% of thujone (Banthorpe et al., 1973; Kamdem et al., 1993; Von Rudloff, 1962). α -thujone, also present in wormwood (*Artemisia absinthium*), was thought to be responsible for the toxicity of liquor absinthe which was very popular in France in the end of XIX and early XX centuries. The spirit was reported to cause fits and hallucination and sometimes led to psychoses as believed to be the case for numerous artists and writers, among whom Vincent van Gogh and Charles Baudelaire (Höld et al., 2000). However, one should keep in mind though that alcohol content in that drink could have been a cause of many of the described troubles and not necessarily the thujone constituent itself (Pelkonen et al., 2013).

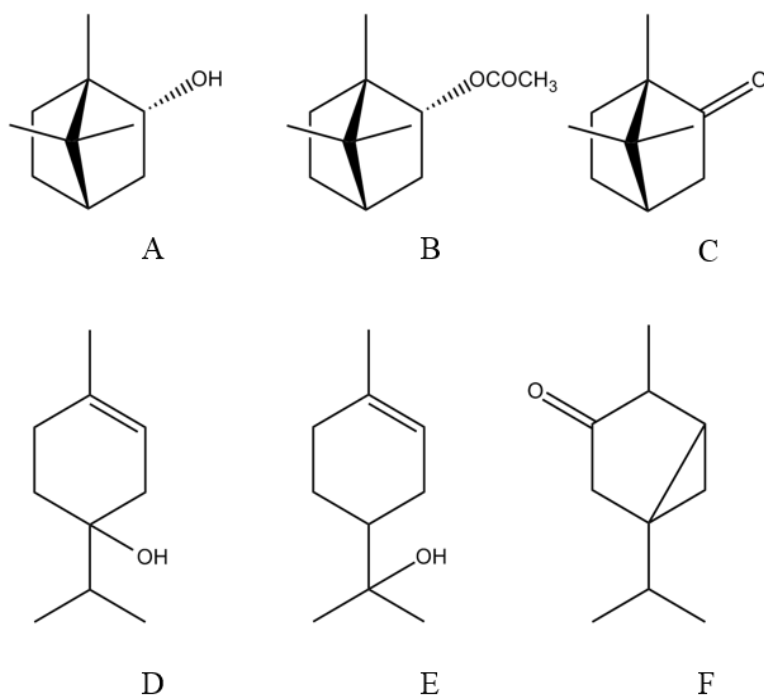


Figure 3.6. Oxygenated monoterpenoids found in needle essential oils; A) Borneol, B) Bornyl acetate, C) Camphor, D) Terpinen-4-ol, E) α -Terpineol, F) Thujone.

3.2.2.3. Essential oils from wood

Essential oils distilled from conifer wood possess a very distinct pattern from the ones of needles or turpentine, as they contain very few monoterpenoids but great proportion of heavier sesquiterpenoids. Their yields vary between 1 and 5%. In conifer species, the so-called “cedarwood oils” are essential oils distilled from wood, but two different cedarwood oils must be distinguished: the ones from true cedars of the *Cedrus* genus and the ones from *Juniperus* and *Thuja* genera woods, assimilated to cedarwood. Oils from true cedar such as Atlas cedar (*Cedrus atlantica*), Himalayan cedar (*Cedrus deodara*) and cedar of Lebanon (*Cedrus libani*) are similar in composition as they are mainly composed of sesquiterpenoids α -, β - and γ -himachalene, and α -atlantone (Figure 3.7) (Başer & Demircakmak, 1995; Chalchat et al., 1994; Chaudhary et al., 2009).

Cedarwood from *Thuja* genus such as white cedar (*Thuja occidentalis*) provides, in addition to its well-known leaf essential oil, a distinct essential oil from its wood, rich in sesquiterpenes occidentalol, occidol isomers, occidenol, and α -, β -, and γ -eudesmols

(Andersen et al., 1995) (Figure 3.7). It is interesting to indicate that occidentalol, one of the volatile constituents of *Thuja occidentalis* resin is released during the drying of its wood. Occidentalol, in form of white crystals, envelop the kiln-drying installations, demonstrating an easy access to this pure sesquiterpene from wood drying (Roy et al., 1984).

Famous cedarwood essential oils from the wood of *Juniperus* genus are produced in the USA at a commercial scale: Virginia cedarwood (*Juniperus virginiana*) and Texas cedarwood (*Juniperus mexicana*) oils. Almost entirely composed of sesquiterpenoids, these oils contain thujopsene, cedrene isomers and its alcohol derivative, cedrol (Figure 3.7). The latter, precipitates into a “cedarwax”, especially when oil is distilled from fresh wood (Guenther, 1952). As mentioned previously for occidentalol in thuja, pure cedrol crystallizes in the kilns tubing when fresh lumber from Virginia and Texas cedarwood are dried (Guenther, 1952).

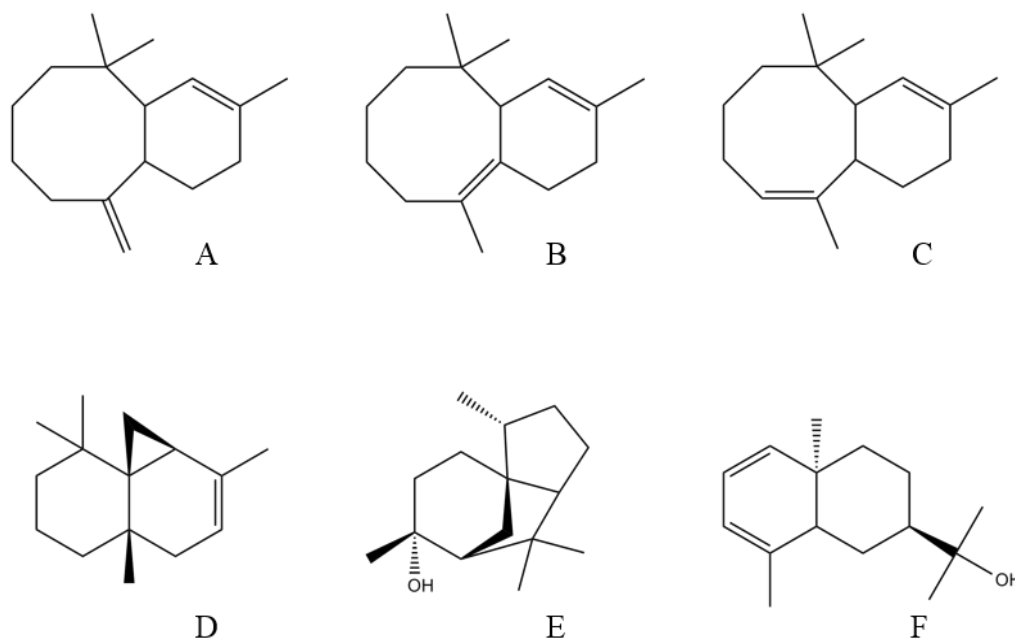


Figure 3.7. Sesquiterpenes in conifer wood oils; A) α -Himachalene, B) β -Himachalene, C) γ -Himachalene, D) (-)-Thujopsene, E) Cedrol, F) Occidentalol.

3.2.2.4. Essential oils from bark

Like foliage, bark is a residue of wood transformation. Huge amounts of bark produced annually by the timber industry from debarking of logs are burnt, with all their valuable molecules lost. The bark of conifers contains oleoresin, therefore an essential oil can be distilled from bark in the same way as from wood. There is no essential oil from conifer bark currently available on the market, but researches have started paving the way for a better use of this forest biomass. Studies on pine species *Pinus brutia* and *Pinus pinaster*, reported essential oils of different composition compared to those from needle or turpentine oils (Bagci et al., 2011; Zolfaghari & Iravani, 2012). Olfactory assay on needle, twigs and bark essential oils from Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) revealed that the one from bark recreated the typical fir odor with a good balance of (*Z*)- and (*E*)- β -ocimene, β -pinene, sabinene and α -terpinolene. Bark from balsam fir (*Abies balsamea*) and black spruce (*Picea mariana*), the most commercially important trees in the Canadian timber industries, produced essential oils rich in α - and β -pinenes but almost devoid of bornyl acetate which is a major compound of their respective needle oils (Francezon & Stevanovic, 2017a; Ross et al., 1996). As for black spruce bark oil, the absence of bornyl acetate makes its scent less pungent. However, both oils have the same fragrance pattern, as the needle oil drydown is very similar to bark oil whole odor. Thus, improvements are still necessary in order to make bark essential oil production industrially relevant (yields of distillation, reproducibility, investigations on potential applications) but it could be a good alternative for the timber industry for their post-harvesting treatment.

3.2.2.5. Hydrodistillation: toward a better improvement of the process

Essential oils from different parts of conifer trees are extracted by steam distillation which consist of a stream of steam carrying off volatile molecules and sometimes by hydrodistillation in which raw material is immersed in boiling water. Steam with volatile compounds then condenses to yield an essential oil and a hydrosol (distillate water condensed with the essential oil floating). Hydrosol is a fragrant water, composed of low percentage of solubilized essential oil, which mainly contain oxygenated monoterpenes. A distillation water corresponding to wastewater inside the distiller tank, along with solid residues, is also

produced. This distillation water can be regarded as a hot water extract of the raw material, retrieving hydrosoluble heavier molecules such as polyphenols. Known for their health benefits, polyphenols are natural powerful antioxidants exhibiting a wide range of therapeutic activities such as anti-inflammatory, anticarcinogenic or cardioprotective (Manach et al., 2005; Middleton et al., 2000). These two aqueous extracts, co-products of distillation, are most of the time discarded, considered less valuable than essential oils. However, better uses can be made of them. Hydrosols for example, can be redistilled or extracted with solvent to recover the dissolved oil, known as “secondary oil” (Fleisher, 1991; Rao et al., 2002) or even used as such in aromatherapy. Conifer hydrosols from black spruce, scots pine or balsam fir bark have demonstrated analgesic, calming, and anti-inflammatory properties among other (Price & Price, 2004).

As for wastewaters drained from the distiller tank, recent studies have highlighted their potential as new sources of bioactive molecules. Rusanov et al. (2014) demonstrated that rose oil distillation wastewater was a rich source of polyphenols, among which several quercetin and kaempferol glycosides have been identified. As for conifers, wastewater from black spruce bark essential oil distillation was determined to have comparable antioxidant capacity and polyphenol content than its hot water extract (Francezon & Stevanovic, 2017b). Needles, which are the main tree part used for conifer essential oil production also contain antioxidant phenolics (Chaouche et al., 2013; Ennajar et al., 2009; Kähkönen et al., 1999; Strack et al., 1989) that can be retrieved in wastewaters after hydrodistillation. Waste treatment as source of bioactive molecules has become an important issue, especially for food and natural ingredient industries, as several studies have revealed the high concentrations of polyphenols with antioxidant activity in these residues and their potential uses as a low-cost raw material (Balasundram et al., 2006; Moure et al., 2001). Thus, this could become a new integrated approach for essential oil industries, especially those using forest biomass.

3.3. Uses of conifer resins and essential oils

3.3.1. Therapeutic properties of conifer essential oils

Therapeutic activities of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants have been known since ancient times. Ethnobotanical uses of conifers have been reported from People of First Nations. Carrier people of British Columbia, Canada, used conifer pitch and oleoresins (*Abies lasiocarpa*, *Picea engelmannii* x *P. glauca*, *Pinus contorta*) to prevent infections and treat burns, wounds, sores or dermatological disorders (Ritch-Krc et al., 1996). Eastern Canada indigenous people (Iroquoian and Algonkian) used *Abies balsamea*, *Larix laricina*, *Picea* spp., *Pinus* spp., *Tsuga canadensis*, and *Thuja* resins and gums in a variety of topical ailments to treat burns, abscesses and itching. *Picea* spp. resins were also used against tuberculosis and *Pinus* spp. and *Thuja occidentalis* as olfactory stimulants (Arnason et al., 1981). In Europe, ethnobotanical uses of *Pinus* spp. resins were referenced in Turkey for skin, respiratory affections and digestive diseases treatments and as analgesic (Kızılarıslan & Sevg, 2013). First scientific experiments, conducted by Buchholtz in 1875 on antimicrobial activity of essential oils paved the way to systematic investigations of their pharmacological properties. Since 1926, conifer essential oils (from pine needle and turpentine) were referenced in the German pharmacopeia along with famous lavender, eucalyptus, thyme or rosemary oils, and then in the European pharmacopeia (Pauli & Schilcher, 2010). With the emergence of alternative medicine, aromatherapy and well-being, the use of essential oils increased and consequently the number of scientific experiments on their bioactivities. Even though the studies on conifer essential oils remained scarce compared to those on aromatic plants and spices.

3.3.1.1. Antimicrobial activity

Antimicrobial activity is undoubtedly the oldest empirically known essential oil bioactivity. Conifer essential oils, originating from resins, have a natural antimicrobial function to protect the tree. Indeed, resin has antibacterial and antifungal roles to fight against pathogens proliferation when the bark is wounded.

Massive screening of antimicrobial activity conducted on hundreds of essential oils and aromatic ingredients (Maruzzella & Sicurella, 1960; Morris et al., 1979) revealed overall weak bioactivities of conifer essential oils against routinely tested pathogenic strains *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus fecalis*, *Salmonella typhosa*, except for pine oil and balsam fir oil. Several studies on both gram negative and gram positive bacteria and fungi have demonstrated only moderate antimicrobial activity of conifer needle oils, while no activity against *E. coli* was detected (Bađci & Diđrak, 1996; Hong et al., 2004; Oh et al., 2007; Pichette et al., 2006). Nonetheless, essential oil from *Picea abies* young shoots showed good antimicrobial activity against gram positive bacteria (Kartnig et al., 1991). It was also found active against gram positive food contaminant bacteria *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes* and *S. aureus* (Canillac & Mourey, 2001), while pine needle oil was found active against 18 isolated strains of *L. monocytogenes* (Lis-Balchin & Deans, 1997). In addition, *Abies koreana* oil was demonstrated efficient against methicillin-resistant *S. aureus* strain, responsible for nosocomial infections (Jeong et al., 2007).

Indeed, the potential of forest essential oils might be underestimated, as demonstrated by Poaty et al., (2015) for seven essential oils from North American boreal conifers, in a study investigating their antibacterial and antifungal activities. Using an improved microdilution test with strip tubes with caps, it has been demonstrated that all studied oils were active. Moreover, jack pine and tamarack oils showed the most potent activity against bacteria *S. aureus*, *E. coli*, *S. tiphimurium* and *S. enteritidis*, which was similar to clove and lemon eucalyptus. Antifungal activity against fungi *Aspergillus niger* and *Aureobasidium pullulans* was also demonstrated, with jack pine (*Pinus banksiana*) and white cedar (*Thuja occidentalis*) being the most active.

Focusing on the active antibacterial components of essential oils, Dorman et al. (2000) tested 22 pure terpenoids on 25 bacterial strains. The phenolic constituents of oils, carvacrol, thymol and eugenol, showed the highest antimicrobial activity, being both bactericidal and bacteriostatic. None of them are, however, well represented in conifer essential oils. Despite this, other powerful antibacterial compounds, such as alcohols α -terpineol and terpinen-4-ol (Dorman & Deans, 2000; Kotan et al., 2007) are widely distributed in the Pinaceae family

and ketones such as thujone (Figure 3.6) is a major compound in western red cedar (*Thuja plicata*) and eastern white cedar (*Thuja occidentalis*) for example. Hydrocarbon monoterpenes, for instance α - and β -pinene showed weaker activities. To illustrate this point, Monterey pine (*Pinus radiata*) and cypress (*Cupressus sempervirens*) oils, characteristic for their monoterpene hydrocarbon pattern and representatives of resinous oils, were tested together with essential oils rich in benzyl esters (ylang-ylang, *Cananga odorata*), phenylpropanoids (curcuma, *Curcuma longa*), phenolics (thyme, *Thymus vulgaris*) and ketones (rosemary, *Rosmarinus officinalis*). Even if *P. radiata* foliage oil showed a specific narrow spectrum activity against the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, conifer oils showed an overall weaker activity against food-spoilage microorganisms (Sacchetti et al., 2005).

On the other hand, α - and β -pinene, main constituents of turpentine oils and widely distributed in conifer oils, were reported to fight against pathogenic bacteria especially strains responsible for jaws infections, parodontitis and periodontitis, as well as against fungi and yeasts such as *Candida albicans* and other related species (Mercier et al., 2009). Nevertheless, synergy between compounds in essential oils are more often responsible for the complete biological effect rather than a single major molecule (Burt, 2004).

Testing antimicrobial activity of essential oils has become a routine in scientific papers. The huge data generated, as well as their growing use in aromatherapy and well-being therapies helped considering essential oils as potential natural antibiotics. The application of essential oils for air decontamination for buildings is also based on antimicrobial properties of conifer oils, as proposed by Hudson et al. (2011) in their study with white cedar oil (*Thuja plicata*). However, *in vivo* experiments are still required to validate their effectiveness.

3.3.1.2. Anticancer

Nature provided highly efficient drugs against cancer, such as Vinca alkaloids (vincristine, vinblastine) or diterpene-based paclitaxel. Discovered in yew bark *Taxus brevifolia*, the latter belongs to the same terpene family as constituents of conifer resins. Being costly to extract, several semi-synthesis approaches were studied and one of them involves α -pinene as precursor (Wender et al., 1997) which is widely available in turpentine pine oil as major

compound. Aside from being a potential precursor, α -pinene was reported to have anticancer properties itself. Significant inhibitory effect of α -pinene was demonstrated on hepatoma carcinoma cells responsible for liver cancer (Chen et al., 2015a) and cytotoxicity was shown against human cancer cell lines *in vitro* for both α and β -pinene (Setzer et al., 1999). Besides, pine needle essential oil, rich in pinenes, was used as anticancer agent in Traditional Chinese Medicine (Chen et al., 2015a). Balsam fir essential oil demonstrated cytotoxicity against tumor cancer cell lines (Legault et al., 2003). Sesquiterpene α -humulene, a minor compound was found to be the active molecule partially responsible for anticancer activity of balsam fir. Cho et al. (2014) demonstrated that Korean nut pine (*Pinus koraiensis*) needle essential oil could be a potential chemotherapeutic agent for colorectal cancer, as it reduced *in vitro* proliferation and migration of colorectal cancer cells. Moreover, *P. koraiensis* cone oil may promote anti-metastatic activity in breast cancer cells (Lee et al., 2015). Other conifer essential oils such as *Cedrus libani* (rich in α , β , and γ -himachalene isomers), *Pinus pinea* (composed of 65% limonene) and *Juniperus oxycedrus* (containing *cis*-thujopsene and δ -cadinene) wood oil as well as *Juniperus excelsa* fruit oil showed remarkable activity against multidrug-resistant leukemia cells, indicating that they could be used to treat drug-resistant and refractory tumors (Saab et al., 2012). *Pinus densiflora* needle essential oil was reported anti-proliferative, anti-survival and pro-apoptotic on human oral squamous cell carcinoma, an oral cavity cancer (Jo et al., 2012).

3.3.1.3. Anti-inflammatory and wound-healing

Since ancient times, cedar wood *Cedrus deodora* is known for its analgesic properties, as it was used in Ayurvedic medicine to treat inflammations and rheumatoid arthritis. Cedarwood oil was indeed proven as effective analgesic, in writhing and hot plate tests in mice and showed anti-inflammatory activity against both exudative-proliferative and chronic phases of inflammation on the carrageenan-induced pedal edema test in rats (Shinde et al., 1999). Essential oil from another *Cedrus* genus member, *Cedrus libani* cone essential oil was found to have remarkable wound healing and anti-inflammatory activities together with *Abies cilicica* subsp. *cilicica* cone oil (Tumen et al., 2011). As reported by Gülçin et al. (2003),

Pinus nigra turpentine had a higher analgesic effect than the reference medicine metamizol in mice writhing test.

3.3.1.4. Other bioactivities

Several pine needle oils (*Pinus brutia*, *P. halepensis*, *P. nigra*, *P. pinea*, and *P. sylvestris*) tested as cholinesterase inhibitor demonstrated moderate to high activity, making them potential therapeutic agent for Alzheimer disease (Ustun et al., 2012). Essential oil of *Pinus koraiensis* could be used against hyperlipidemia, a metabolic disorder inducing obesity, diabetes and cardiovascular diseases (Kim et al., 2012). Siberian fir needle oil was determined to affect bone metabolism *in vivo* by inhibiting bone resorption in a dose dependent manner. Therefore, it can be used to prevent bone loss in osteoporosis models (Mühlbauer et al., 2003). Cedarwood (*Cedrus libani*) oil showed antiviral activity against herpes simplex virus (Loizzo et al., 2008).

After the Second World War, studies on the use of essential oils in aromatherapy were conducted in France and Italy in order to assess their therapeutic action when inhaled. They were found to have remarkable properties in relieving symptoms of anxiety and in mood improvements (Benaim, 1984; Warren & Warrenburg, 1993). Inspired by the “Shinrin-yoku” (taking in the forest atmosphere or forest bathing) trend in Japan (Tsunetsugu et al., 2010), studies on therapeutic effect of essential oil by inhalation have revealed the calming and relaxing properties of conifer essential oils. α -pinene, a generally detected compound in the air of coniferous forest, was reported to induce relaxed physiological state (Tsunetsugu et al., 2010). Sesquiterpenoid cedrol inhalation was demonstrated to positively modulate cardiovascular and respiratory functions (Dayawansa et al., 2003). *Abies sachalinensis* oil showed a significant anxiolytic-like effect *in vivo* after inhalation on mouse models, providing evidences of therapeutic activity of essential oils on emotional behavior modulation (Satou et al., 2011). Siberian fir oil (*Abies sibirica*), tested by inhalation on humans, seemed to assist recovery from mental fatigue caused by visual display terminal work that could be linked to mental health disturbances and sleep-related psychiatric disorders (Matsubara et al., 2011). Forgotten since long time, healing properties of essential oils by inhalation are yet to be discovered again.

3.3.2. Conifer scent in the perfumer's palette

A deep invigorating breath in the forest undergrowth, the memories of luxuriant Christmas trees fragrance and the relaxing smell of traditional sauna made out of wood illustrate the wide diversity of familiar conifer's scent. While belonging to the woody olfactory family, conifer scents profile range broadly from sweet balsamic aroma of cedar woods to fresh penetrating resinous note of pines, spruces and firs. Woody scents are mostly used as base notes in perfume compositions, providing the lasting impression in the drydown period when top notes are evaporated. Associated with heart notes, base notes create the full body of a fragrance, they ground and support the composition. In addition, they can stay on the skin for hours. Very pliable and adaptable, woody scents are often associated to masculine compositions although they well match feminine fragrances as well.

In the woody note palette, alongside with the famous sandalwood, cedarwood essential oils display sweet and sensual fragrances. True cedars, Atlas cedarwood (*Cedrus atlantica*) and Himalayan cedarwood (*Cedrus deodora*) are deep, warm, woody sweet and slightly camphoraceous. True cedars must not be confused with the so-called Virginian cedarwood (*Juniperus virginiana*) which is actually a juniper. Virginian cedarwood scent is woody-dry, soft, earthy and reminiscent of wood pencils. Cedarwood is extensively used in perfumery as a base note for woody, ambery and oriental fragrances and also as a lighter alternative to precious sandalwood. Both belonging to the oldest fragrances in perfumery and among most commonly used notes, cedarwood is a classic ingredient in the perfumer's palette. Serge Lutens' line of perfume offers diverse interpretations of cedarwood scent, from cedar dedicated "Féminité du bois" and "Cèdre" to harmonies with spices in "Bois oriental" and fruity scents in "Bois et fruits" to a sensual duo in "Bois et musc" (Fragrantica, 2017). An example of fragrance dominated by cedarwood would be the very famous designer's perfume "Terre d'Hermès" by Hermès.

On the other side of the woody scents, firs, spruces and pines needle essential oils embody the strong fresh resinous fragrance, characteristic of conifer boreal forest. Pine needle oils (mainly scots pine and maritime pine) are penetrating, icy-fresh and herbaceous, whereas spruces (black spruce, white spruce) are more resinous and balsamic. Fir oils evoke Christmas tree scent: balsam and Siberian firs have a woodier note whereas grand fir and

silver fir possess a lemony note. Conifer needle essential oils are less frequently used than sweet cedarwood as a major note for mass perfume compositions. Niche perfumery however would fairly create more committed fragrances, using conifer scent as overreaching structure. Indeed, conifer oils can be employed as top to middle note, and spread to base note. Evocative examples from niche perfumer are “Fille en aiguilles” by Serge Lutens or “Nuit étoilée” by Annick Goutal (Fragrantica, 2017), which united pine and fir oils to offer their own representations of pine forests in perfumes. Pine and fir oils are used as a main note in many fragrances from niche perfumers, “In the woods” by Esentielle, “Boisé” by Patyka but also in famous perfume such as “Eau des merveilles” by Hermès or “Kenzo for men” by Kenzo. Unfortunately, only few compositions contain spruce scents. Natural niche perfumers however created dedicated fragrances like “Black spruce” by Teone Reinthal or “Rainforest” and “Orcas” by Ayala Moriel. Spruce note can also be found in “Tommy boy” by Tommy Hilfiger as a base note (Fragrantica, 2017).

3.3.3. Conifer resin in archeological and art objects

The traditional use of diterpenoid resins in the past was as components of adhesive formulations applied in fabrication of various objects, the application in objects of art being of particular importance for world cultural heritage. The resins most readily available in Europe and especially in the Mediterranean region are of the specific interest for overview here. The resins obtained from conifer species belonging to Pinaceae family are of particular interest in this context. Various pines and larches were the most important sources of resins in terms of quantities produced, mainly due to their important distribution in the region and particularly to large diameters of their resin ducts (especially so in case of pines). Even though the resins from common European conifer species are composed of similar diterpenoid resin acids, they still contain some marker constituents, some of which may influence their rheological properties and thus could have defined their use by artisans and artists from Antiquity through Renaissance and modern times.

3.3.3.1. Use of resins in adhesive formulations

Pine resins have been most commonly used in Italy and elsewhere in Europe as finishing adhesives in combination with crushed and finely dispersed colored marbles in oils, among which linseed oil was particularly often used in paintings. The study performed by use of gas chromatographic analysis of a sample taken from the altar place from Santo Stefano church (from XV century) in Venice provided interesting results in comparison with the results of analysis of the fresh resin from typical pine species belonging to subdivision Diploxyton. Namely, the resins from all Diploxyton pines contain considerable amounts of pimaric/sandaracopimaric acids, the only exception to that pattern being the Aleppo pine (*Pinus halepensis*) growing in the coastal region of Mediterranean. The resin from Aleppo pine is distinguishable by absence of pimaric/sandaracopimaric acids. Thus, Mills and White (1977) described the analysis and authentication of resinous adhesive from altar of church Santo Stefano in Venice (constructed between XII and XV centuries). The gas chromatogram revealed no trace of pimaric/sandaracopimaric acids which brought up the conclusion that the resin used was effectively from Aleppo pine growing in coastal region.

Yet another example of diterpene resin use as adhesive is mosaic gluing applied in East Corinth in coastal Greece at Aegean Sea. The absence of any other resin acid apart from dehydroabietic acid brought to conclusion that the original resin was used in molten form obtained by intensive heating, probably in order to improve the resin malleability. Indeed, the chromatogram obtained from Diploxyton pine type resin analyzed after heating to 300 °C exhibited the same features: major peak for dehydroabietic acid, important concentrations of terpenic hydrocarbons and the absence of the other oxidation product of abietic acid, the 7-oxo-dehydroabietic acid. Its absence is ascribed to non-oxidizing conditions in which the mosaic had dwelled, since the panel of mosaic were submerged in water. They explain the dark color of resin rather by process of heating the resin, excluding the use of tar as such, available otherwise from the pine wood dry-distillation (used in Antiquity for charcoal and tar production) since the latter would not have the properties required for slow gluing. The mosaics were dated by ¹⁴C analysis to mid fourth century A.D.

Another remarkable example of importance of use of conifer resins as adhesives is the analysis of a fabric wrapping the detachable ram at prove of the warship sunk and found

underwater near Marsala in Sicily, dated from Punic wars (third century B.C.). It is amazing to which extent the original composition of pine resin was preserved: with abietic acid and isopimaric/palustric acid peaks larger than dehydroabietic acid peak! The anaerobic conditions under the sea, provided by decaying plants (producing methane) could have contributed to protection against oxidation. In this case, the use of conifer tar (from dry distillation of wood) is also a likely material as it was used to provide preservation of wood from which the ships were constructed in the Antiquity (naval stores).

3.3.3.2. The resin/wax mixtures used as thin protective films in Renaissance paintings

The interest for conifer resins use in the past stems not only from a need to understand the ways of their application in various materials and objects of art but also from the need to design the good conservation practices to be applied to the archeological and art objects. The understanding of the chemical composition of the materials used to surface treatment of paintings for example, provides also an insight into the general practices of an artist.

Renaissance artists used very often the Venice turpentine from European larch *Larix decidua* for moldering and waxing the painting surfaces. The name Venice turpentine comes from the city where the resin was marketed while it was commonly tapped from larches (*Larix decidua*) growing in the Tirol region of Austria. Wax component was usually a beeswax, constituted by stearic and palmitic acids. A wax relief from Victoria and Albert Museum dating from XVI century was sampled and the methanol extract was analyzed after methylation by gas chromatography. The typical larch resin constituents, epi-manool, larixol and larixol acetate (Figure 3.4) were determined, along with the oxidation products of abietane type acids, dehydroabietic and 7-oxo-dehydroabietic acids (Figure 3.1). The conclusion of Mills and White was that the Venice turpentine had probably been mixed with cheaper pine resin for relief molding used by Giovanni Bologna (Mills & White, 1977).

Also often used resin in Renaissance was that from cypresses, rich in communic acid derivatives. It is amazing to discover how Leonardo da Vinci cautioned about time and mode of sampling of cypress resin which “had to be collected in April-May and used quickly after collection” (Kononenko et al., 2016). Even in relation to this material uses of resin, Leonardo

da Vinci's extraordinary capacity of observation is again evidenced. The commercially available sandarac resin, which is provided by tapping of Atlas thuja (*Tetraclinis articulata*) growing in Northern Africa, a member of Cupressaceae family as well, was examined to study the polymerization of its constituent communic acid.

Russo and Avino (2012) have examined the terpenoid resin used as binder in the XV century painting of Antonello da Messina from Uffizi Gallery collection. Antonello da Messina is the Renaissance master very much inspired by Flemish painting. He is credited to be the first artist who had introduced oil painting in Italy. The oil painting is applying the protection layer consisting of mixture of terpenic resin and siccative oil, most commonly linseed oil (mixture of palmitic and stearic acid and unsaturated fatty acids). The sample from the da Messina painting "Madona con bambino e angelli" was examined by micro FT-IR and GC-MS (Russo & Avino, 2012). The authors declared that the resin used was Venice turpentine from European larch even though they were unable to detect larixol or its acetate, which is curious as these constituents are usually found in Venice turpentine which was the most appreciated at the time of Antonello da Messina work. It is also interesting that the larch resin (Venice turpentine) has been otherwise proven to survive centuries. Thus, the results of gas-chromatographic analysis of methylated resin fraction of the material used by Giovanni da Bologna (known also as Gianbologna) to create the relief "Christ rejected by the Jews" (relief dated 1579, ECCE HOMO, now exposed in Victoria and Albert Museum in London), clearly confirmed the presence of epi-manool, larixol and larixyl acetate, marker constituents of Venice turpentine. The very important concentration of dehydroabietic acid in examined sample is attributed to the probable use of less expensive pine resin (Mills & White, 1977) which could have been also the case with the painting of da Messina discussed previously.

The wax reliefs of Gianbologna served for casting of bronze reliefs ordered for the Grimaldi Chapel in San Francesco di Castelletto, Genoa, now conserved at the University of Genoa. It is curious to read that the Victoria and Albert museum panel describes the object as "red wax on wooden ground", without a mention of resin ingredients which are certainly of primary importance for its conservation. We cite "Wax is a delicate medium and therefore the physical survival of these pieces is remarkable, suggesting they were especially valued". They certainly have been valued which explains their conserving after casting in bronze,

which would not have been a common practice for less valuable work. The study of Mills and White adds to our understanding of the survival of these objects for over five centuries and crucial to understanding of the sculpturing work of Gianbologna, for which use of conifer resin was of prime importance.

3.4. Conclusion

Conifer species belonging to Pinaceae and Cupressaceae family are widely distributed in forests of Europe and North America. They are well-known for production of terpenoid resins which are composed of volatile part containing mono- and sesquiterpenoids and solid part constituted of various diterpenoids. The extraordinary properties of these complex molecules have been exploited in the past in various fields, for design of different materials, but also in health and art products. They are continually being explored for their fragrance properties in perfumery and their biological properties are continuing to interest researchers for applications in health products and aromatherapy. These fascinating molecules have helped preserve numerous objects of art which make part of world heritage. It is therefore extremely important to share the knowledge about these precious forest substances and continue the research for finding their new and innovative applications.

Chapitre 4 Composition chimique de l'huile essentielle et de l'hydrolat des écorces résiduelles de *Picea mariana*

Chemical Composition of Essential Oil and Hydrosol from *Picea mariana* Bark Residue

Nellie Francezon et Tatjana Stevanovic

Article publié dans *Bioresources*, 12(2), 2635-2645.

Résumé

Une huile essentielle à partir de l'écorce de l'épinette noire a été produite pour la première fois, selon deux méthodes d'hydrodistillation différentes: l'entraînement à la vapeur (SD) et la distillation à l'eau (WD). Les deux procédés ont produit deux huiles essentielles de rendements et compositions chimiques équivalents. S'apparentant aux térébenthines, les huiles essentielles obtenues sont constituées majoritairement d' α -pinène (40%) et de β -pinène (34% à 26%), suivis des monoterpènes hydrocarbures β -phellandrène, 3-carène et limonène. Les hydrolats (eaux de distillation) obtenus durant les procédés ont également révélé des compositions similaires, riches en composés oxygénés : α -terpinéol, *trans*-pinocarvéol, terpinen-4-ol, verbénone, bornéol et pinocarvone. Les huiles essentielles d'écorce d'épinette noire issues des deux procédés d'hydrodistillation testés possèdent une composition très différente de celle de l'huile essentielle d'aiguille disponible sur le marché, très concentrée en acétate de bornyle.

Mots-clés : épinette noire, écorce, valorisation, huile essentielle, hydrolat, composition chimique

Abstract

For the first time, the essential oil of black spruce (*Picea mariana*) bark residue was obtained using two types of hydrodistillations: steam distillation (SD) and water distillation (WD). Both gave similar yields and compositions as analyzed using gas chromatography and mass spectrometry. The essential oil composition is turpentine-like with the predominance of α -pinene (40.6% SD; 40.5% WD) and β -pinene (33.9% SD; 25.9% WD), followed by hydrocarbon monoterpenes β -phellandrene (4.8% SD; 3.6% WD), 3-carene (4.1% SD; 3.1% WD), and limonene (4.0% SD; 3.7% WD). Hydrosol's composition is rich in oxygenated compounds with α -terpineol (29.3% SD; 33.5% WD), *trans*-pinocarveol (5.2% SD; 3.7% WD), terpinen-4-ol (5.0% SD; 5.8% WD), verbenone (4.9% SD; 5.4% WD), borneol (4.9% SD; 3.9% WD), and pinocarvone (4.6% SD; 4.3% WD). These black spruce bark essential oils differ in composition from those from needles, which are commercially available and rich in bornyl acetate.

Keywords: black spruce, *Picea mariana*, bark, valorization, essential oil, hydrosol, chemical composition

4.1. Introduction

Coniferous trees are known for their pleasant resinous and terpenic smell that is characteristic of the forest atmosphere. Several essential oils from softwoods that are obtained by hydrodistillation of the needles are available on the market, *i.e.*, essential oils of pine, fir, or spruce. Another well-known conifer essential oil is turpentine oil distilled from the oleoresin of *Pinus* species.

The essential oils and oleoresins of those conifers that contain resin canals can be found in all plant parts. However, the composition of the essential oils obtained from different parts of the same plant can vary from little differences (yields) to important dissimilarities (composition). For example, two different essential oils are produced from the cinnamon tree, one from leaves containing 87% eugenol as the major component and one from bark containing 97% of cinnamaldehyde (Singh et al., 2007). As previously reported, the composition of essential oils from conifers can also vary depending on the part analyzed (Kubeczka & Schultze, 1987).

Black spruce (*Picea mariana* (Miller) B.S.P.) is one of the most important industrial species of the Canadian boreal forest. Its processing during logging and wood transformation generates huge amounts of biomass residues, consisting of 13% foliage, 6% branches, and 8% bark per tree on an oven dry basis (Desrochers, 2011). The foliage is currently used to produce the essential oil of black spruce, which is widely used in aromatherapy. Shaw described its composition for the first time with bornyl acetate as its main compound (37%), followed by α -pinene (16%), camphene (10%), β -pinene (6.5%), and limonene (6.5%) (Guenther, 1952; Shaw, 1950). The hydrosol from black spruce needles obtained during hydrodistillation (also named distillation water), has been studied by Garneau et al. (2012). Its composition is rich in oxygenated monoterpenes, mainly composed of α -terpineol (14.8%), borneol (13.5%), bornyl acetate (7.8%), and terpinen-4-ol (6.5%). As for the bark, investigations have been made to produce a hot water extract enriched in polyphenols (Diouf et al., 2009; Garcia-Perez et al., 2012), but no study has yet dealt with its hydrodistillation to produce an essential oil. Moreover, very few reports exist to date on the chemical composition of an essential oil made from conifers' stem bark, and none was found concerning the *Picea* genus.

The present study aims to characterize the chemical composition, by gas chromatography and mass spectrometry, of essential oils and hydrosols of the residual stem bark of *P. mariana*, issued from two different procedures: steam distillation and water distillation.

4.2. Experimental

4.2.1. Materials

The analytical standard molecules for gas chromatography analysis, α -pinene, β -pinene, limonene, camphor, 4-ethylphenol, borneol, camphene, sabinene, α -phellandrene, 3-carene, *p*-cymene, α -terpineol, verbenone, *cis*-myrtenol, bornyl acetate, β -caryophyllene, and carvone were purchased from Sigma Aldrich (St-Louis, USA). The *n*-hexane and anhydrous sodium sulfate were purchased from Fisher Scientific (Tustin, Canada). Fresh bark of black spruce (*P. mariana*) was supplied by Boisaco Inc's sawmill, located in Sacré-Coeur, Québec, Canada. The bark was collected in June 2015 from the sawmill debarking of logs originating from Labrieville sector, 140 km from Forestville, Québec, Canada. The bark was milled and sieved to select particles from 2 mm to 1 mm and then stored at -20 °C in the dark.

4.2.2. Methods

4.2.2.1. Separation of volatile constituents

Essential oils were obtained via two different methods: steam distillation (SD) and water distillation (WD). The device used for the hydrodistillation was composed of an aluminum 20 L still (All American, Hillsville, USA) modified in the author's workshop to meet the experimental needs with a heating system, a connection to steam entrance (2 L/h steam flow) and a condenser (Schmidt, 2015). To extract the essential oil by steam distillation, the steam was introduced through the plant material to carry the volatile molecules to the condenser to produce the floating essential oil and the hydrosol. The water distillation was performed using the same conditions except for the still, which was filled with 15 L of hot water to have plant material completely immersed during the process. Boiling water created a stream of steam carrying volatile compounds to the condenser (Boutekedjiret et al., 2003). For each,

200 g of fresh bark (corresponding to 73 g of dry matter) was processed for 6 h to obtain 34.3 mg of oil with SD and 38.7 mg with WD. Then, 350 mL of each hydrosol produced during WD and SD were submitted to extraction with 3×200 mL of *n*-hexane. The extractions were performed in triplicates. The obtained oils and hydrosol extracts were dried over anhydrous sodium sulfate and stored at 4 °C before analysis.

4.2.2.2. Gas chromatography analysis

Gas chromatography (GC) was performed on a Varian CP-3800 Gas Chromatography (Varian Inc., Walnut Creek, USA) equipped with a Flame Ionization Detector (FID). Separation was achieved on an Agilent J&W VF-5ms (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) 5% phenyl-methyl column according to the following temperature program: 50 °C to 200 °C at 3 °C/min. The injector and detector temperature were 250 °C and 285 °C, respectively, and the carrier gas He was applied at 1 mL/min. There was 1 μ L of sample injected with a split ratio 1:10. Relative percentage amounts of the separated compounds were calculated from FID chromatograms.

4.2.2.3. Gas chromatography-mass spectrometry analysis

The gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analyses were performed on a Varian Saturn 2200 GC/MS/MS (Varian Inc., Walnut Creek, USA). The mass spectrometry (MS) was operated in an electronic ionization mode by electronic impact at 70 eV and the MS signal acquisition was set between 30 *m/z* and 600 *m/z*. The column and conditions of temperature were identical to those used in the GC-FID analysis. Peak identification was performed by comparison of the mass spectra with those available in the NIST 02, Adams, and Essentia databases, and by comparison of their retention index values with literature reporting results using a VF-5ms column as often as possible (Chaftar et al., 2016; De Pinho et al., 2009; Feijó et al., 2014; Guerrini et al., 2014; Hennebelle et al., 2006; Leffingwell & Alford, 2011; Nurzyńska-Wierdak, 2014; Robinson et al., 2011; Rossi et al., 2011). The retention index values were calculated according to the Kovats-Kramer equation using a mixture of saturated alkanes (C₇-C₃₀) (Supelco, Bellefonte, USA) as a reference.

Identification was confirmed with analytical standards available in the author's laboratory when possible.

4.3. Results and discussion

4.3.1. Essential oils composition

The yields of the essential oils of black spruce bark produced either via steam distillation or water distillation were determined to the same value of 0.05%. For comparison, this yield was ten times lower than that reported for the hydrodistillation of *P. mariana*'s needles (0.4% to 0.6%) (Guenther, 1952). Von Rudloff (1975) later reported a higher extraction yield of 1.3% from black spruce needles compared to 0.3% from the twigs.

The chemical compositions of the essential oils produced from black spruce bark by steam and water distillation were quite similar (Table 4.1). They were both mainly composed of hydrocarbon monoterpenes; some sesquiterpenes were also determined, due to water distillation being slightly more efficient to extract sesquiterpenes (2.9% compared to 0.8% of the total oil for steam distillation). The proportion of sesquiterpenes has been reported to rarely exceed 10% in conifer needle oils previously studied, and they seem to be very scarce in *Picea* oils in general (Kubeczka & Schultze, 1987). Oxygenated monoterpenoids make up part of the composition of oils obtained from black spruce bark, being less important in the essential oil from SD than in the oil obtained from WD. Indeed, water distilled essential oil contained 18 oxygenated compounds that represented 6.3% of the oil against the 6 oxygenated monoterpenes for the steam distilled counterpart, which was 1.1%. This could have been explained partially by the chemical conversion that occurred in the presence of water during water distillation, which resulted from potential hydrolysis reactions of the hydrocarbon monoterpenes that led to monoterpene alcohol formation (Boutekedjiret et al., 2003).

The major black spruce bark essential oil constituent was the bicyclic monoterpene α -pinene that represented almost half of the total composition, 40.6% and 40.5% for the steam distilled and water distilled oils, respectively (Figure 4.1). Its isomer β -pinene was the second major compound with a high rate of 33.9% for SD and 25.9% for WD. Thus, the pinenes represented

more than two thirds of the black spruce bark essential oil, which showed the same characteristics as turpentine oils (Stevanovic & Perrin, 2009), mostly from *Pinus* genus. For comparison, the chemical composition of *Picea abies* turpentine revealed the same pattern with a predominance of α -pinene (54.3%) and β -pinene (25.3%) (Borg-Karlson et al., 1993), which confirmed that the volatile part of oleoresins from the *Picea* genus have compositions comparable to those of volatile oils from *Pinus*. The wood of *P. mariana* extracted with hexane was reported to contain α -pinene and β -pinene as the main monoterpenes as well, at 19% (heartwood) and 15% (sapwood) of the total hexane extract along with heavier diterpenoids (Pichette et al., 1998). As was reported for the turpentine oil of *P. abies* (Borg-Karlson et al., 1993), three other main molecules 3-carene, limonene, and β -phellandrene were found in equivalent proportions in both the steam distilled and water distilled oils from black spruce bark studied in this research.

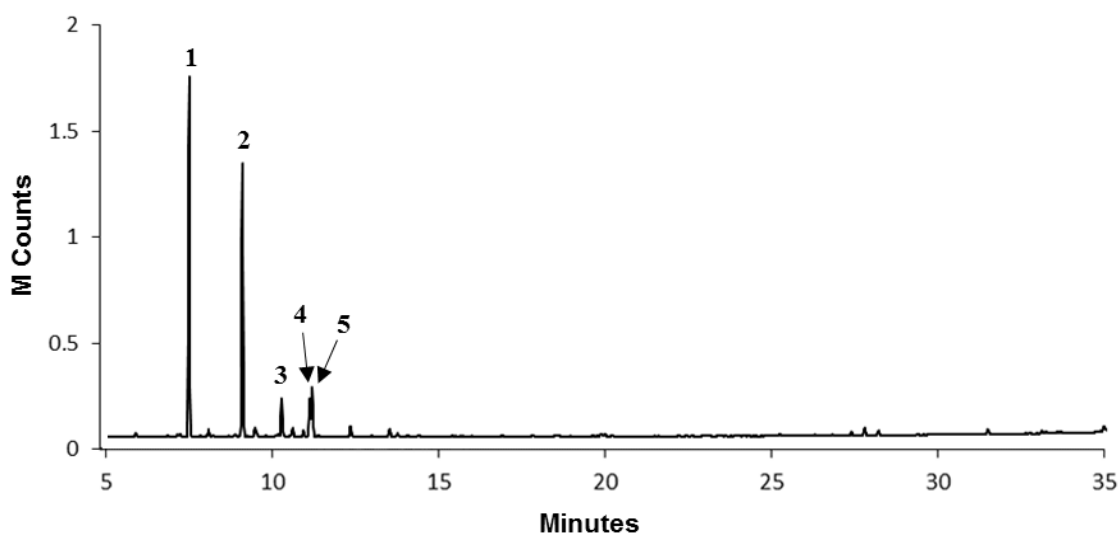


Figure 4.1. Gas chromatogram of the essential oil of black spruce bark; Identification of the major peaks: 1: α -pinene; 2: β -pinene; 3: 3-carene; 4: limonene; and 5: β -phellandrene

Thus, the essential oil of *P. mariana* bark was mainly composed of hydrocarbon monoterpenes, whereas the *P. mariana* needle essential oil was constituted of 37% to 46.5% (Guenther, 1952; Von Rudloff, 1975) of the oxygenated monoterpene bornyl acetate. Bornyl acetate was determined only in trace amounts in the black spruce bark essential oil. This result was in accordance with previous literature (Von Rudloff, 1975), where bornyl acetate

represented only 1.3% of the oil from twigs (rich in bark and juvenile wood) while it was the major constituent of the oil from *P. mariana* needles. Von Rudloff also reported great amounts of α - and β -pinene (18.4% and 9.8%, respectively) in the twigs but the highest compound present was 3-carene, which constituted for half of the total twig oil composition. These differences could perhaps have been explained by the degree of maturity of the plant tissue: juvenile bark and wood in twigs were compared with mature stem bark in this study. Thus, hydrocarbon monoterpenes are the most common constituents of conifer resins, especially pinenes, sabinene, 3-carene, and limonene (Kubeczka & Schultze, 1987), whereas the oxygenated monoterpenoids were more abundant in the flowers or leaves' essential oils (Stevanovic & Perrin, 2009). This can be easily seen in the chromatogram (Figure 4.1): the essential oil chromatogram shows a noticeable abundance of compounds in the region of hydrocarbon monoterpenes, whereas the oxygenated monoterpenes region was nearly empty.

4.3.2. Hydrosols composition

The hydrosols produced during both procedures were rather similar in composition and showed comparable concentrations of terpenoids (60 mg/L for SD and 56 mg/L for WD) (Table 4.2). They were exclusively composed of oxygenated monoterpenoids; α -terpineol was the major constituent, that represented one third of the total identified hydrosol constituents amongst *trans*-pinocarveol, terpinen-4-ol, borneol, verbenone, and pinocarvone (Figure 4.2). The only noticeable difference between the two hydrosols was the absence of hydrocarbon monoterpenes and sesquiterpenes in the water distilled hydrosol. The SD hydrosol contained α - and β -pinenes (1.1% and 1.5%, respectively), limonene, β -phellandrene, and some sesquiterpenes. However, the presence of hydrocarbon monoterpenes remained very low in hydrosols due to their poor solubility in water compared to oxygenated monoterpenoids (Rao et al., 2002); α -terpineol solubility in water reached 710 mg/L compared to 2.49 mg/L and 4.89 mg/L for α - and β -pinenes (Garneau et al., 2012).

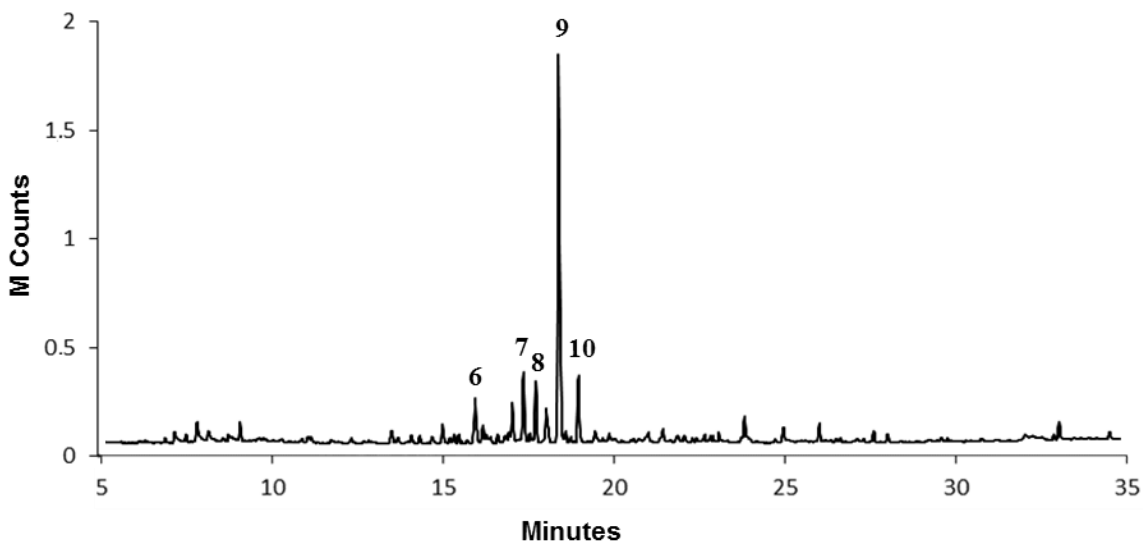


Figure 4.2. Gas chromatogram of the hydrosol of black spruce bark; Identification of the major peaks: 6: *trans*-pinocarveol; 7: borneol; 8: terpinen-4-ol; 9: α -terpineol; and 10: verbenone.

Interestingly, in black spruce needle hydrosol, α -terpineol was also identified as the main constituent along with borneol, bornyl acetate, and terpinen-4-ol (Garneau et al., 2012). The presence of α -terpineol was also reported in the hexane extract of black spruce wood (Pichette et al., 1998).

Hydrosols could be used in the perfume industry, cosmetics, or as food ingredients. They could also be further extracted with another lipophilic solvent to obtain the “secondary” oil in opposition to the primary one that naturally evaporates during distillation. According to Rao et al., blending the primary and the recovered oil from hydrosols gave more richness and fullness to the oil (Fleisher, 1991; Rao et al., 2002).

Table 4.1. Compositions of essential oils from steam distillation and water distillation

Compounds	RI	SD EO ^a (%)	WD EO ^b (%)	Identification ^c
Santene	881	0.3	0.4	MS, RI
Tricyclene	924	0.2	0.4	MS, RI
α -Thujene	926	0.2	trace	MS, RI
α-Pinene	934	40.6	40.5	Std, MS, RI
Camphene	951	0.6	1.1	Std, MS, RI
2,4(10)-Thujadiene	954	0.1	trace	MS, RI
Sabinene	973	0.2	0.1	Std, MS, RI
β-Pinene	980	33.9	25.9	Std, MS, RI
Myrcene	988	1.7	1.1	MS, RI
α -Phellandrene	1008	0.3	trace	Std, MS, RI
3-Carene	1010	4.1	3.1	Std, MS, RI
α -Terpinene	1018	0.6	0.6	MS, RI
<i>p</i> -Cymene	1026	0.5	0.5	Std, MS, RI
Limonene	1030	4.0	3.7	Std, MS, RI
β-Phellandrene	1032	4.8	3.6	MS, RI
γ -Terpinene	1059	0.9	1.2	MS, RI
Terpinolene	1086	0.6	1.0	MS, RI
Dehydro- <i>p</i> -cymene	1092	0.3	0.3	MS, RI
Linalool	1100	-	0.2	MS, RI
1,3,8- <i>p</i> -Menthatriene	1114	trace	0.1	MS, RI
<i>exo</i> -Fenchyl alcohol	1122	-	0.2	MS, RI
α -Campholenal	1129	-	0.2	MS, RI
<i>trans</i> -Pinocarveol	1144	-	0.4	MS, RI
Camphor	1151	-	0.1	Std, MS, RI
<i>cis</i> - β -Terpineol	1159	-	0.1	MS, RI
Pinocarvone	1165	0.2	0.1	MS, RI
Borneol	1175	-	0.3	Std, MS, RI
Pinocamphone	1180	-	0.2	MS, RI
Terpinen-4-ol	1183	-	0.7	MS, RI
α -Terpineol	1199	0.1	1.2	Std, MS, RI
Verbenone	1212	-	0.1	Std, MS, RI
Thymol methyl ether	1231	0.3	0.1	MS, RI
4-Ethylguaiaicol	1275	-	0.1	MS, RI
Phellandral	1282	0.1	trace	MS, RI
Bornyl acetate	1286	-	0.1	Std, MS, RI
(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	1297	0.2	1.0	MS, RI
2-Methoxy-4-vinylphenol	1313	-	0.9	MS, RI
(<i>E,Z</i>)-2,4-Decadienal	1321	0.2	0.3	MS, RI
Longicyclene	1399	0.3	1.5	MS, RI
Longifolene	1414	0.3	1.0	MS, RI
β -Caryophyllene	1423	0.2	0.3	Std, MS, RI
α -Humulene	1458	-	0.1	MS, RI
Monoterpenoids	-	95.0	89.9	-
Sesquiterpenoids	-	0.8	2.9	-
Oxygenated compounds	-	1.1	6.3	-
Total compounds	-	95.8	92.8	-

Notes: a: steam distilled essential oil; b: water distilled essential oil; c: MS (Mass Spectra), RI (Retention Index), and Std (Standard molecule). Molecules in bold are major compounds.

Table 4.2. Compositions of hydrosols from steam distillation and water distillation

Compounds	RI	SD hyd ^a (%)	WD hyd ^b (%)	Identification ^c
α -Pinene	934	1.1	-	Std, MS, RI
β -Pinene	980	1.5	-	Std, MS, RI
Limonene	1030	0.6	-	Std, MS, RI
β -Phellandrene	1032	1.0	-	MS, RI
<i>p</i> -Guaiacol	1087	1.1	1.1	MS, RI
Linalool	1100	0.8	0.5	MS, RI
Phenyl ethyl alcohol	1115	0.5	0.6	MS, RI
<i>exo</i> -Fenchyl alcohol	1122	1.5	1.0	MS, RI
α -Campholenal	1129	1.4	0.3	MS, RI
<i>p</i> -Menth-3-en-1-ol	1137	-	0.4	MS, RI
<i>trans</i>-Pinocarveol	1144	5.2	3.7	MS, RI
(<i>E</i>)-Verbenol	1149	1.2	-	MS, RI
Camphor	1151	0.8	0.3	Std, MS, RI
<i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	1153	0.6	0.9	MS, RI
<i>cis</i> - β -Terpineol	1159	0.9	0.6	MS, RI
Pinocarvone	1165	4.6	4.3	MS, RI
4-Ethyl-phenol	1172	0.8	4.2	Std, MS, RI
Borneol	1175	4.9	3.9	Std, MS, RI
Pinocamphone	1180	1.0	-	MS, RI
Terpinen-4-ol	1183	5.0	5.8	MS, RI
<i>p</i> -Cymen-8-ol	1189	3.0	4.4	MS, RI
α-Terpineol	1199	29.3	33.5	Std, MS, RI
Verbenone	1212	4.9	5.4	Std, MS, RI
<i>trans</i> -Carveol	1217	0.9	1.4	MS, RI
<i>cis</i> -Carveol	1234	-	0.4	MS, RI
Carvone	1246	-	0.4	Std, MS, RI
Piperitone	1258	1.6	0.9	MS, RI
<i>cis</i> -Myrtanol	1268	1.4	1.3	Std, MS, RI
4-Ethylguaiacol	1275	0.7	2.6	MS, RI
<i>p</i> -Cymen-7-ol	1292	0.7	0.7	MS, RI
(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	1297	4.6	0.5	MS, RI
2-Methoxy-4-vinylphenol	1313	-	5.8	MS, RI
(<i>E,Z</i>)-2,4-Decadienal	1321	3.1	0.9	MS, RI
<i>p</i> -1,4-Menthadien-7-ol	1331	-	0.3	MS, RI
1,2,4-Trimethoxybenzene	1370	1.5	0.3	MS, RI
Vanillin	1398	-	0.4	MS, RI
Longifolene	1414	0.8	-	MS, RI
β -Caryophyllene	1423	1.2	-	Std, MS, RI
α -Bisabolene	1475	2,9	-	MS, RI
Monoterpenoids	-	86.2	86.8	-
Sesquiterpenoids	-	4.9	0.0	-
Oxygenated compounds	-	82.0	86.8	-
Total compounds	-	91.1	86.8	-

Notes: a: steam distilled hydrosol; b: water distilled hydrosol; c: MS (Mass Spectra), RI (Retention Index), and Std (Standard molecule). Molecules in bold are major compounds.

The results obtained in this study indicated the potential of valorization of two products, essential oil and hydrosol, issued from black spruce bark steam or water distillation. The essential oil was mainly composed of terpene hydrocarbons that resembled the composition of turpentine oils that corresponded to the volatile part of spruce oleoresins. Each of these products could find appropriate specific applications.

4.4. Conclusions

This was the first study that reported the characterization of volatile oil and hydrosol obtained by steam or water distillation of black spruce bark. The essential oil from black spruce bark was constituted of monoterpene hydrocarbons, with a predominance of α - and β -pinene. Oxygenated volatile components, with the major constituent α -terpineol, were determined to be concentrated in the hydrosol, water-soluble fraction of the oil. The results obtained for steam distillation and water distillation of black spruce bark were comparable both in terms of volatile oils and hydrosols yields and their compositions. The essential oil production from black spruce bark, even though it led to a very low yield, could be optimized to reach a more acceptable rate using more material in a scale-up process.

This study represents a new approach to the valorization of bark as a wood transformation waste via production of a new essential oil of black spruce bark that could be extrapolated to bark residues of other conifer species.

Chapitre 5 Procédé intégré pour la production d'extraits naturels à partir de l'écorce de l'épinette noire

Integrated Process for the Production of Natural Extracts from Black Spruce Bark

Nellie Francezon et Tatjana Stevanovic

Article publié dans *Industrial Crops and Products*, 108, 348-354.

Résumé

Cette étude présente un procédé intégré d'extraction de l'écorce d'épinette noire permettant la production simultanée d'une huile essentielle, d'un hydrolat et d'un extrait à l'eau chaude enrichi en polyphénols, tout en préservant la capacité calorifique de l'écorce pour la production d'énergie. Deux types d'hydrodistillation ont été testés: l'entraînement à la vapeur (SD) et la distillation à l'eau (WD). La présente recherche se focalise sur les extraits à l'eau chaude; les huiles essentielles et hydrolats étant très similaires. L'extrait vidangé suite à la distillation à l'eau (WD-DE) a été obtenu avec un haut rendement (21,6%), des taux de polyphénols et de proanthocyanidines suffisants ainsi qu'une concentration remarquable de *trans*-resvératrol et des activités antioxydantes préservées (DPPH et ORAC). Le pouvoir calorifique des écorces hydrodistillées n'a révélé aucune perte de valeur combustible. Le procédé intégré d'extraction représente une nouvelle approche pour la valorisation complète de l'écorce de l'épinette noire.

Mots-clés : *Picea mariana*, écorce, valorisation, huile essentielle, polyphénol, resvératrol

Abstract

Black spruce bark is an underestimated by-product from Quebec wood industry containing important quantities of valuable chemicals. We are presenting here an integrated process leading to a simultaneous extraction of an essential oil, a hydrosol and a polyphenol enriched hot water extract while the residual bark remains available for heat generation due to its preserved calorific value. Two types of hydrodistillation were tested: steam distillation (SD) and water distillation (WD). Since no difference was found between the two processes neither in respect to the essential oil and hydrosol production nor in respect to their chemical compositions, the focus of the present research was on the hot water extracts obtained from the two processes. The drained extract from water distillation process (WD-DE) was obtained at high yield (21.6 %), and was determined to have the phenol and proanthocyanidin contents (337 mg GAE/g, 139 mg CChE/g) in the same range as the control (extract from simple hot water extraction), along with the remarkable concentration of *trans*-resveratrol (627 mg/100g dry extract). The results of DPPH radical and ORAC tests indicate that all studied extracts have antioxidant activities, especially the WD-DE. Higher heating values of the remaining bark after extractions were determined to be almost identical as those of the original bark (around 20 MJ/kg), indicating that black spruce bark would still be available for combustion, otherwise its conventional use, after the extraction. The integrated process of black spruce bark extraction presented here represents a new approach to the complete valorization of residual bark from wood transformation.

Keywords: *Picea mariana*, bark, valorization, essential oil, polyphenol, resveratrol

5.1. Introduction

Around 17 million m³ of bark are produced every year in Canada, as a by-product of wood transformation (Cheng et al., 2006). Produced by sawmills from the debarking of logs, this biomass, which represents an important issue for the timber industry, is mainly burnt to generate energy. Forest biomass is known to be very rich in bioactive compounds (Stevanovic & Perrin, 2009), especially bark, the extractive contents of which can reach 25 % for softwood species (Harkin & Rowe, 1971). Furthermore, knowing that some well-known therapeutic molecules were discovered in barks, such as anticancer paclitaxel in *Taxus baccata* L., anti-inflammatory precursor salicylic acid in *Salix alba* L. or anti-malaria quinine in *Cinchona officinalis* L., bark residues from wood transformation can be used more efficiently to produce valuable chemicals and extracts.

Black spruce (*Picea mariana* (Miller) B.S.P.), one of the most abundant coniferous tree of Canadian boreal forests, is widely used in sawmills for the quality of its wood. Its residual bark has been the subject of chemical studies lately, in order to find new profitable uses of this little known raw material. Diouf et al. (2009) reported the black spruce bark hot water extract having no toxicity on cell lines, as well as antioxidant and anti-inflammatory bioactivities, associated to high polyphenol contents. Known for their health benefits, polyphenols are natural powerful antioxidants also described to be cancer preventive, chemoprotective, hepatoprotective and cardioprotective among others (Manach et al., 2005; Middleton et al., 2000). Highly bioactive compounds such as *trans*-resveratrol and taxifolin were found in the hot water extract (Diouf et al., 2009; Garcia-Perez et al., 2012), making it a potential active ingredient for nutraceuticals, cosmetics or even pharmaceuticals.

Waste treatment as source of bioactive molecules has become an important issue, especially in food and natural ingredient industries, as several studies have revealed the high concentrations of polyphenols with antioxidant activity in these residues and thus their potential uses as a low-cost raw material (Balasundram et al., 2006; Moure et al., 2001). Researches have been performed on the recovery of bioactive polyphenols from essential oil bearing plants and industrial wastes from hydrodistillation process. Navarrete et al. (2011) successfully performed the extraction of antioxidant phenolic compounds from rosemary *Rosmarinus officinalis* with ethanol, after retrieval of the essential oil by hydrodistillation.

Elzaawely et al. (2007) established an extraction protocol to obtain the essential oil, the specific compound dihydro-5,6-dehydrokawain and enriched phenolic extracts from *Alpinia zerumbet*. Boulila et al. (2015) used enzyme-assisted extraction to extract natural antioxidants from *Laurus nobilis* leaf hydrodistilled residue. Rusanov et al. (2014) isolated the non-volatile polyphenols from the rose oil distillation wastewater drained from the distiller tank. Previous work on black spruce bark showed that essential oils were extractable from bark (Francezon & Stevanovic, 2017a), using classical steam and water distillations. Essential oils and hydrosols from both steam distillation and water distillation were equivalent in terms of composition and yields. The black spruce bark essential oil yields were determined to be around 0.05%, for both of studied processes, which is 10 times lower yield than that obtained for black spruce needle essential oil. The two thirds of essential oil from black spruce bark were determined to be composed of α - and β -pinene (Francezon & Stevanovic, 2017a). These two isomers possess several bioactivities such as bactericide, fungicide, insecticide, anticarcinogenic, antioxidant and sedative (Mercier et al., 2009) and might act in synergy with other constituents of the essential oil: β -phellandrene, 3-carene and limonene. Hydrosols were determined to be composed mainly of oxygenated monoterpenes: α -terpineol, *trans*-pinocarveol, terpinen-4-ol, verbenone, borneol. (Francezon & Stevanovic, 2017a). Present in important concentration (one third of the organic fraction of the hydrosol), α -terpineol is of interest due to its multiple bioactivities, such as anticancer, anti-inflammatory, antibacterial and antifungal (Hassan et al., 2010). Apart from being available as potential active ingredients for cosmetics, pharmaceuticals or aromatherapy, essential oil and hydrosol of black spruce bark possess a pleasant woody fragrance that could enrich the perfumer's palette.

Taking into account that wastewater is also produced during hydrodistillation of black spruce bark, and that the hot water extract enriched in polyphenols was already partly studied, the idea of developing an integrated process, which combines hydrodistillation and hot water extraction simultaneously led us to design the research presented here. In this study, we considered two different types of hydrodistillation routinely used in essential oil industry (steam distillation and water distillation), evaluating the production of the hot water extract left behind by comparing the extraction yields and their quality to classical hot water extraction (simple water extraction of bark). The remaining bark residue after retrieval of

valuable chemicals was tested for its higher heating value to check its suitability for its common use, heat production.

5.2. Materials and methods

5.2.1. Plant material and chemicals

Fresh bark of black spruce was supplied by Boisaco Inc sawmill (Sacré-Coeur, Québec, Canada). Collected in June 2015 from logs cut in the Labrieville sector, 140 km from Forestville (Québec, Canada), bark was then washed, milled and sieved. Particles from 2 to 1 mm were selected for further processing and stored at -20 °C in darkness. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH), 2,2-azobis-2-aminopropane dihydrochloride (AAPH), gallic acid, cyanidin chloride, Folin Ciocalteu's phenol reagent, ferrous ammonium sulfate were purchased from Sigma Aldrich; *n*-hexane, *n*-butanol, methanol, anhydrous sodium sulfate, anhydrous sodium carbonate, hydrochloric acid, were supplied from Fisher Scientific (Tustin, Canada); Oligopin[®] was from DRT group (Dax, France).

5.2.2. Protocol and process

The integrated process was performed using two different methods of hydrodistillation: steam distillation (SD) and water distillation (WD) as previously described (Francezon & Stevanovic, 2017a). The device used for the process is an alembic type apparatus composed of an aluminum 20 L still (All American, Hillsville, USA) modified to meet the experimental requirements (Figure 5.1). 200 g of black spruce fresh bark (corresponding to 73 g of dry material) was placed in a two stages basket above the steam entrance. As for the steam distillation, vapor went through the plant material and carried off the volatile molecules to the condenser to produce the floating essential oil and the hydrosol (distillation water) during 6h. Inside the still, natural condensation of vapor created an aqueous extract at the bottom. The water distillation was performed using the same conditions except that the still was filled with 15 L of boiling water in order for the plant material to be totally immersed during the

process. In the end of each distillations, three extracts were recovered: the essential oil (EO), the hydrosol (Hyd) and the hot water drained extract (DE) (Figure 5.2).

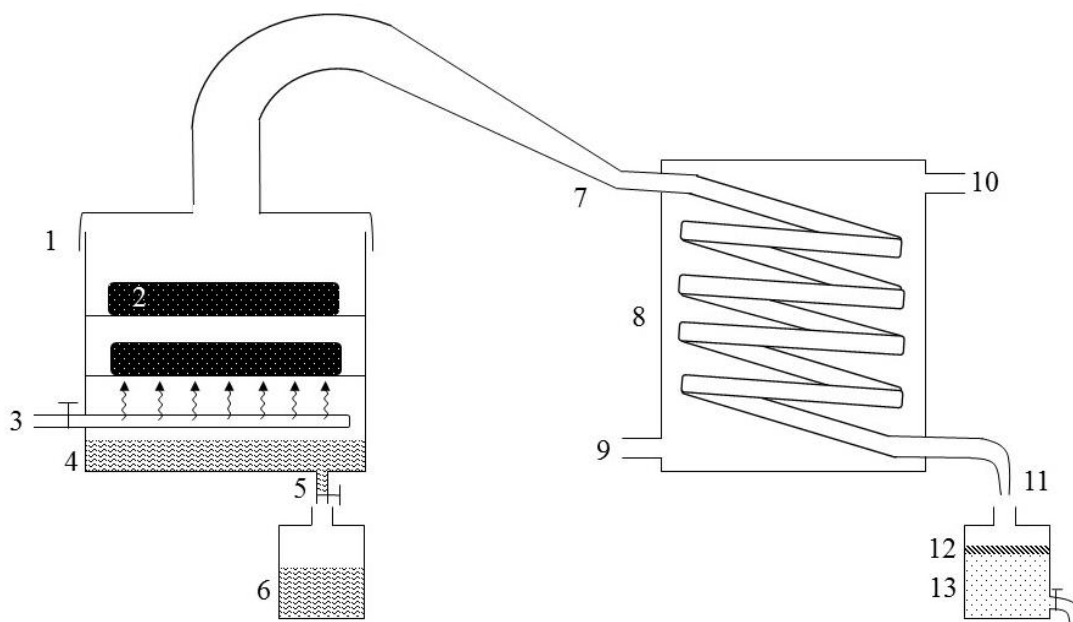


Figure 5.1. Steam distillation process scheme. 1: still, 2: bark, 3: steam entrance, 4: recondensed water, 5: draining exit, 6: drained extract, 7: steam with volatile molecules, 8: condenser, 9: cooling water entry, 10: cooling water exit, 11: recondensed water exit, 12: essential oil, 13: hydrosol.

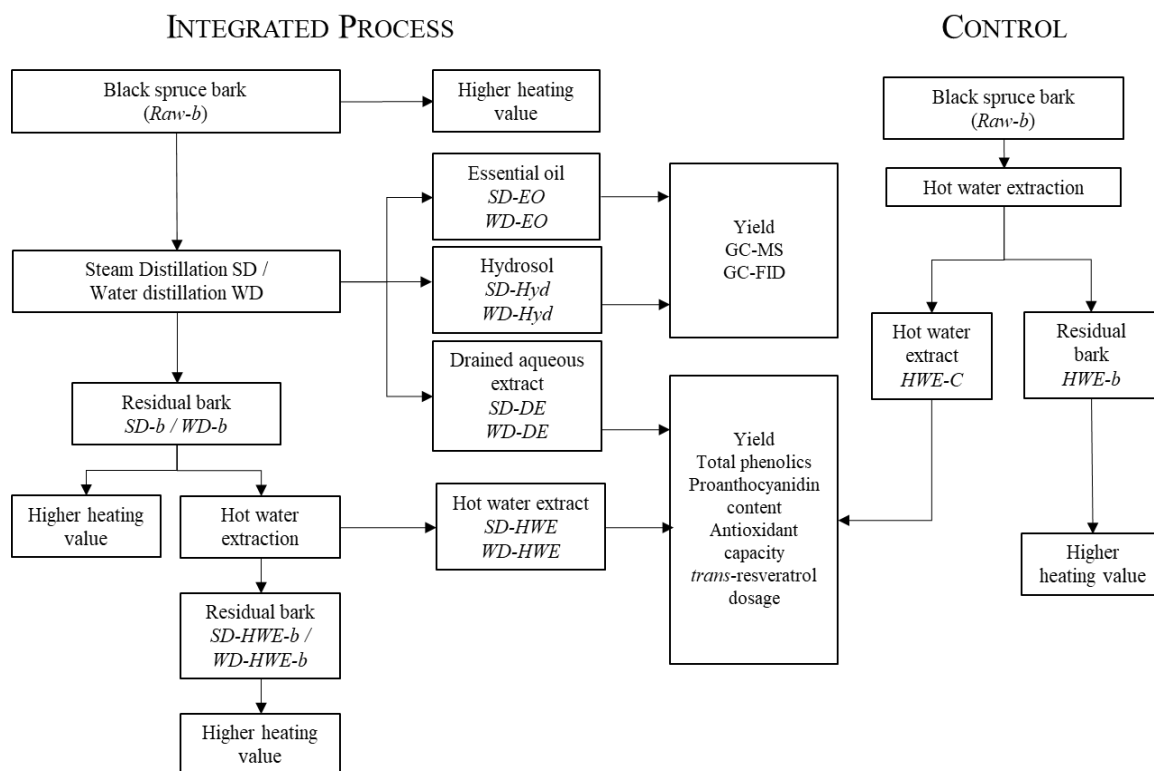


Figure 5.2. Diagram of experiment protocol. Names in italic refer to extract names.

The essential oils and hydrosols were treated and analyzed as described in our previous work (Francezon & Stevanovic, 2017a). Briefly, 34.3 mg of oil was obtained with SD and 38.7 with WD. Hydrosols were determined to contain 60 mg/L of organic molecules for SD and 56 mg/L for WD. As for hot water extracts drained from the still (SD-DE and WD-DE), 500 mL aliquots of each were freeze-dried in triplicate with a Labconco FreeZone 12 L Console Freeze Drying System (Labconco, Kansas City, USA). Extraction yields of hot water drained extracts were expressed in percentage as the ratio of the dry extract mass upon dry bark extracted mass.

5.2.3. Hot water extraction of bark samples

Three different black spruce bark samples: original bark as a control experiment, steam distilled bark and water distilled bark, were extracted with hot water and analyzed as HWE-C (control classical hot water extraction), SD-HWE (hot water extraction of steam distilled

bark) and WD-HWE (hot water extraction of water distilled bark) (Figure 5.2). 10 g of air-dried bark sample was extracted with 100 mL of distilled water under reflux (100 °C) for 1h and filtrated with a Whatman N°3 filter (Diouf et al., 2009), then 100 mL of water was used to wash the extracted bark. Aqueous filtrate (200 mL) was freeze-dried with a Labconco FreeZone 12 L Console Freeze Drying System (Labconco, Kansas City, USA). Each extraction was performed in triplicate.

5.2.4. Total phenol and proanthocyanidin contents of bark extracts

The total phenol contents of five black spruce bark extract samples (SD-DE, WD-DE, SD-HWE, WD-HWE and HWE-C) were measured with the Folin–Ciocalteu colorimetric test following the procedure described by St-Pierre et al. (2013). Briefly, 0.5 mL of sample (100 µg/mL) was mixed with 2.5 mL of the Folin–Ciocalteu reagent (1:10 v/v) and 2.0 mL of an aqueous sodium carbonate solution (75 g/L), heated at 50 °C during 10 min and cooled for another 10 min. The absorbance was read at 760 nm using UV-visible spectrophotometer Varian Cary50 (Varian Inc., Walnut Creek, USA). Results were expressed in Gallic acid equivalents (mg GAE / g of dry extract) using a gallic acid standard curve done in triplicate ($y = 0.0227x - 0.0083$; $R^2 = 0.9994$). Proanthocyanidin content of the five black spruce bark extracts was measured as described by Porter et al. (1985). Concisely, 1 mL aliquots of each extract diluted in methanol (480 µg/mL) was reacted with 6 mL *n*-butanol:HCl (95:5) and 200 µL of 2% ferrous ammonium sulfate ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$) in HCl (2N) at 95 °C during 50 min. Absorbance was then read at 550 nm against a blank. Proanthocyanidin content was expressed in cyanidin chloride equivalent (mg CCE/g dry extract) using a cyanidin chloride calibration curve ($y = 0.0298x$; $R^2 = 0.9953$).

5.2.5. DPPH assay for antioxidant capacity of the extracts

The free radical-scavenging activity of five samples (SD-DE, WD-DE, SD-HWE, WD-HWE and HWE-C) and the reference Oligopin® was evaluated according to a method adapted from Li et al. (2009), using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical. Briefly, 100 µL of each extract and Oligopin®, diluted in methanol at 100 µg/mL, were tested in triplicate in a 96-

well plate. 150 μ L of DPPH was added in each well (137 μ M final concentration) and absorbance was measured at 515 nm after 30 min. The percentage of inhibition of the DPPH radical was calculated as $I (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$, where A_0 is the absorbance of the reagent blank and A_1 is the absorbance of the samples with DPPH. Percentage of inhibition was then expressed in Trolox Equivalent (TE) with a standard curve of Trolox done in triplicate ($y = 0.0782x + 0.0142$; $R^2 = 0.9785$).

5.2.6. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay

ORAC antioxidant capacity assay was performed on black spruce bark extracts (SD-DE, WD-DE, SD-HWE, WD-HWE and HWE-C) and Oligopin[®] (for comparison) following the procedure described by Kasangana et al. (2015). Briefly, extracts dissolved in acetone/water/acetic acid (70:29.5:0.5 AWA) were reacted with radical 2,2-azobis-2-aminopropane dihydrochloride (AAPH) and fluorescein. Fluorescence was then recorded with a Galaxy fluorimeter (BGM Labtech, Durham, NC, USA) and antioxidant capacity was expressed as micromoles of Trolox equivalent per gram of dry extract (μ mol TE/g) using a standard calibration curve ($y = 0.5235x + 3.6727$; $R^2 = 0.9996$).

5.2.7. Determination of *trans*-resveratrol concentration in black spruce bark extracts by UPLC-MS/MS

UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) analysis for resveratrol dosage was performed on a Waters Acquity Ultra-PerformanceTM LC system (Waters), equipped with a quaternary pump system (Waters) and a Waters Acquity high-strength silica (HSS) T3 column (100 mm_2.1 mm id, 1.8 mm particle size). The mobile phase consisted of 0.1% acetic acid (eluent A) and acetonitrile (eluent B), with a 0.4 mL/min flow-rate. The gradient elution was set as follows: 0-5 min, 5-21.2% B; 5-7 min, 21.2-24% B; 7-7.8 min, 24-37% B; 7.8-10 min 37-41% B; 10-10.2 min 41-90% B; 10.2-11.2 isocratic 90% B; 11.3-13 min isocratic 5% B. Mass spectra analyses were carried out on a TQD mass spectrometer (Waters) equipped with a Z-spray electrospray interface, in negative mode. Data was acquired through multiple reactions monitoring (MRM). Ionization source parameters were capillary voltage,

0.8 kV; source temperature, 150 °C; cone gas flow rate, 50 L/h; desolvation gas flow rate, 800 L/h and desolvation temperature, 400 °C. Nitrogen (99% purity) and argon (99% purity) were used as nebulizing and collision gases, respectively. Data acquisition was carried out with the MassLynx 4.1 software. Results were quantified using a resveratrol calibration curve ($y = -0.0007x^2 + 10.4x$; $R^2 = 0.9977$, concentration range 100-5000 µg/L).

5.2.8. Higher heating value of bark after extraction

The higher heating value (HHV) of bark samples was determined by forming pellets of approximately 0.7 g each and burning them in an oxygen bomb calorimeter (Parr 6400 Automated Isoperibol Calorimeter, Parr Instrument Company, Illinois, USA). The calorimeter was calibrated with a benzoic acid standard (heat of combustion 26.454 MJ/kg). Six different bark samples were analyzed in triplicate: original bark (Raw-b) as a control, steam distilled (SD-b), water distilled (WD-b), steam distilled-hot water extracted (SD-HWE-b), water distilled-hot water extracted (WD-HWE-b) and hot water extracted (HWE-b) (Figure 5.2). Residual bark was air-dried at ambient temperature (20 °C) for 5 days before the experiment. Computations of the higher heating value included corrections for the oven-dry weight of the samples (7 to 9% of initial moisture content of air-dried bark) as follows: $HHV = HHV_w \times \frac{100}{(100 - MC)}$, where HHV is the higher heating value at constant volume of the moisture free fuel, HHV_w is the higher heating value at constant volume of the material as received and MC the moisture content (as percentage by mass on an air-dried basis).

5.2.9. Statistical analysis

Experiments were repeated three times. Analysis of variance (ANOVA), Least Significant Difference test LSD (for extraction yield and phenol content results) and qualitative contrasts (for antioxidant capacity experiment) were performed with SAS software 9.4 (SAS Institute Inc., NC, USA), using $p < 0.05$ as level of statistical significance.

5.3. Results and discussion

5.3.1. Hot water extracts from the integrated process

Steam distillation and water distillation showed different extraction patterns regarding the production of hot water extract enriched in polyphenols, especially for extraction yields. Drained extract obtained from steam distillation SD-DE was considerably diluted (1.4 ± 0.1 %) (Table 5.1) which is the result of poor contact between water (in vapor state) and bark. However, the hot water extraction performed in a second step with steam distilled residual bark SD-b resulted in a very concentrated extract SD-HWE (20.5 ± 1.6 %). As a result, immersion in water seems to be necessary to fully extract hydrosoluble molecules. If only steam is applied, these molecules remain trapped in the raw material. This conclusion is confirmed with the water distillation experiment (WD) in which bark was completely immersed in water for the whole process; the drained extract from water distillation (WD-DE) was obtained in the highest yield of 21.6 ± 1.7 %. Thus, hot water extraction was taking place simultaneously with water distillation, molecules being segregated according to their polarity and their mass. Volatile terpenoids were carried off with the steam and hydrosoluble polyphenols remained in water. Hot water extraction in a second step was tested on the residual bark WD-b as well (as it has been done for steam-distilled bark) and led to a poor yield (2.9 ± 0.3 %), thus confirming that the bark was already exhausted from its extractives during water distillation. It is interesting to note that the yield of the control hot water extract HWE-C (17.8 ± 0.3 %), obtained under carefully controlled bench-scale laboratory conditions, was lower than the yield attained by water distillation. Previous work performed with *P. mariana* bark with the same extraction conditions reported lower extraction yield (Garcia-Perez et al., 2012; Royer et al., 2013). These differences could be due to modifications in the raw material structure during hydrodistillation, which were favorable to an increase in yield (Navarrete et al., 2011). Indeed, the thermal stress lasted for 6 hours during hydrodistillation versus only 1 hour for the classical hot water extraction. To obtain an insight into the chemical composition of the obtained extracts, total phenol and proanthocyanidin contents were determined by spectrophotometry (Table 5.1). Both of drained extracts SD-DE and WD-DE were determined to have high phenol and proanthocyanidin contents, statistically equivalent according to LSD test, and values in same order as the control HWE-C. The second extractions (SD-HWE and WD-HWE) of already

exhausted bark seem to be unnecessary as the drained extracts SD-DE and WD-DE were determined to already have high phenol and proanthocyanidin contents.

Hot water extract from black spruce bark was previously reported to contain great amount of *trans*-resveratrol, well-known for its multiple health benefit (Garcia-Perez et al., 2012). In order to evaluate if the hot water extracts obtained from water distillation and steam distillation contained this molecule of interest, a dosage of *trans*-resveratrol by UPLC-MS/MS was performed. The results presented in table 5.1, reveal that *trans*-resveratrol is actually better retrieved when a hydrodistillation process is applied than from classical hot water extraction. Indeed, WD-DE was determined to have the highest resveratrol content (627 ± 15 mg/100 g of dry extract), three times higher than that from classical extraction, and twice higher than determined in other extracts studied here (from integrated process). Based on the great extraction yield of WD-DE, *trans*-resveratrol content of bark can be estimated as 1355 ± 33 μ g/g of dry bark, which is ten times superior to previously reported by Garcia-Perez et al. (2012). When compared to other commercial polyphenolic extracts rich in resveratrol, water distillation drained extract is richer in resveratrol than red wine (337 mg/100 g dry extract), red grape skin (75-60 mg/100 g dry extract) while lower than in asian herbal medicine *Polygonum cuspidatum* (19719 mg/100 g dry extract) (Counet et al., 2006).

Table 5.1. Extraction yield, total phenolic content, proanthocyanidin (PAs) content, and *trans*-resveratrol content in black spruce bark extracts from integrated process and hot water extract control.

Extracts	Yield (%)	Total Phen (mg GAE/g dry extract)	PAs content (mg CCE/g dry extract)	Resveratrol content (mg/100 g dry extract)	Resveratrol content (μ g/g dry bark)
SD-DE	$1,4 \pm 0,1^d$	330 ± 5^b	132 ± 3^b	306 ± 2^c	$43 \pm 0,3^e$
SD-HWE	$20,5 \pm 1,6^a$	297 ± 11^c	115 ± 3^c	347 ± 14^b	711 ± 28^b
WD-DE	$21,6 \pm 1,7^a$	337 ± 1^b	139 ± 8^b	627 ± 15^a	1355 ± 33^a
WD-HWE	$2,9 \pm 0,3^c$	196 ± 1^d	107 ± 3^c	368 ± 1^b	$107 \pm 0,3^d$
HWE-C	$17,8 \pm 0,3^b$	426 ± 2^a	230 ± 4^a	188 ± 4^d	335 ± 8^c

Values with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA followed by LSD test). SD-DE (Steam Distillation-Drained Extract), SD-HWE (Steam Distillation-Hot Water Extract), WD-DE (Water Distillation-Drained Extract), WD-HWE (Water Distillation-Hot Water Extract), HWE-C (Hot Water Extract-Control).

In order to get a better insight into the antioxidant potential of the studied extracts, antioxidant activity was evaluated according to two different chemical mechanisms: the radical scavenging activity based on single electron transfer (DPPH test) and the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC test) based on hydrogen atom transfer pattern (Table 5.2). As for radical scavenging activity, hot water extracts derived from the integrated process showed lower DPPH radical reduction than positive control Oligopin[®] and control hot water extract (HWE-C). However, the results obtained for the SD-DE and WD-DE were in the same range as the value determined for simple hot water extract, with 729 ± 41 and 733 ± 17 $\mu\text{mol TE/g}$ dry extract, respectively. As for ORAC test, antioxidant capacity of integrated process extracts was determined to be 4991 ± 296 $\mu\text{mol TE/g}$ dry extract for WD-DE. Even if the result obtained for control HWE-C (simple hot water extraction) was still higher (8566 ± 350 $\mu\text{mol TE/g}$), the extracts derived from distillation process were determined to have important antioxidant capacity, and thus can be used as potential natural antioxidants.

Table 5.2. Antioxidant capacity by DPPH and ORAC assays of black spruce bark extracts from integrated process, hot water extract control and positive reference Oligopin[®].

Extracts	DPPH ($\mu\text{mol TE/g}$ dry extract)	ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$ dry extract)
SD-DE	729 ± 41^c	4019 ± 232^d
SD-HWE	563 ± 36^d	4294 ± 233^{cd}
WD-DE	733 ± 17^c	4991 ± 296^c
WD-HWE	308 ± 30^e	2634 ± 95^e
HWE-C	962 ± 11^b	8566 ± 350^b
OP	1056 ± 79^a	20130 ± 933^a

Values with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA followed by LSD test). SD-DE (Steam Distillation-Drained Extract), SD-HWE (Steam Distillation-Hot Water Extract), WD-DE (Water Distillation-Drained Extract), WD-HWE (Water Distillation-Hot Water Extract), HWE-C (Hot Water Extract-Control), OP (Oligopin[®], positive control).

5.3.2. Higher heating value of the residual bark

In order to evaluate the availability of the residual bark for energy production, higher heating value of bark samples from different steps of the process were measured and compared (Table 5.3). The result of ANOVA was significant (F value 14.14, $\alpha < 5\%$) meaning that differences exist between the treatments, thus qualitative comparisons were performed

(Table 5.4). As HHV values for bark samples were quite similar, qualitative comparisons were preferred to LSD test. The only significant difference was between raw bark and processed ones, with α highly inferior to 5%. This result is in accordance with the common idea that the removal of extractives from wood or bark decreases their HHV (Demirbas, 2002; Telmo & Lousada, 2011) especially if extractives are terpenes and resins (White, 1987). However, HHV measured for the six samples vary from 19.88 ± 0.27 to 20.89 ± 0.10 MJ/kg (means of raw data), being only 5% of variation which does not represent a very high difference on an industrial basis (Table 5.3).

Table 5.3. Higher heating value of processed and non-processed black spruce bark. Results expressed by means and standard deviations in parenthesis.

Bark samples	Raw-b	SD-b	SD-HWE-b	WD-b	WD-HWE-b	HWE-b
HHV MJ/kg	20.89 (0.10)	20.06 (0.06)	19.88 (0.27)	20.35 (0.07)	20.51 (0.25)	20.29 (0.11)

Table 5.4. Qualitative comparisons of the HHV of different black spruce bark samples obtained with SAS software.

Contrasts	Raw-b	SD-b	SD-HWE-b	WD-b	WD-HWE-b	HWE-b	F value	Pr > F
Raw vs other bark samples	-5	1	1	1	1	1	42.70	<.0001
Distilled vs Non distilled	0	0	1	0	1	-2	0.20	0.6643
Steam vs Water	0	-1	-1	1	1	0	4.60	0.0531
SD-HWE vs WD-HWE	0	0	1	0	-1	0	2.77	0.1217
SD vs WD	0	1	0	-1	0	0	1.87	0.1966

This could be explained by the low amount of resin and terpenes contained in black spruce bark, even if hydrodistillation process had retrieved part of them. Indeed, there is no real effect of hydrodistillation on the residual bark neither hot water extraction as the former captured low molecular weight hydrocarbons and the latter extracted polyphenols, molecules with high content of oxygen. Since combustion of an organic compound is related to its

chemical composition, organic compounds containing only carbon and hydrogen (such as hydrocarbon terpenes or lipids) produce more energy when burned than those containing oxygen (such as polyphenols) (Senelwa & Sims, 1999). As a result, residual bark after hydrodistillation and hot water extraction is still available for combustion, the minimal amount of terpene hydrocarbons being only removed as essential oil.

5.3.3. Relevance of the integrated process as a biorefinery concept

Black spruce bark is an undervalued by-product of wood transformation, which could be extracted to recover valuable bioactive molecules before combustion. The integrated process was designed to exhaust the black spruce bark raw material from its extractives, both volatile (terpenes and derivatives) and water soluble (mainly constituted of polyphenols) while preserving its calorific value for combustion. Volatile fragrant terpenoids were recovered as a black spruce bark essential oil and a hydrosol from hydrodistillation, while water soluble polyphenols were simultaneously extracted inside the still. Hydrodistillation (*i.e.* steam distillation and water distillation) is the most commonly used process in essential oil industry; distillation units being simple to use and relatively cheap (\$5000-\$10 000, all prices are expressed in USD) (Khan et al., 2014). The idea of the presented research was to provide a new model of enhancing an existing process (hydrodistillation) to get access to high value products.

Several studies already highlighted the potential of residual bark from wood transformation as source of chemicals, such as tannins for adhesive or foam materials, non-cellulosic sugars and residual lignin or even bio-oil after bark pyrolysis (Feng et al., 2013; Kemppainen et al., 2014). The majority of the mentioned studies use drastic solvent or chemical procedures. The integrated process presented here is a green process as it is using water as the only solvent, which can even be recycled with a technique called cohobation (re-injection of condensate water into the still during hydrodistillation). With the results of this study indicating the extract drained from the still after water distillation (WD-DE) was the most promising one, the integrated process is an all-in-one solution, requiring no further steps.

As for the production of essential oils, an improvement of the distillation would be needed in order to increase the low yields obtained, such as a scale-up (Khan et al., 2014; Masango, 2005), even though one should keep in mind that the essential oils are regularly present at very low concentration in plants. Nevertheless, even if yields are low, the high price of essential oils might justify their production. Black spruce needle oil, for example, is sold at \$170 per liter (New Directions Aromatics Inc, 2017) with an average yield of 0.4-0.6% (Garneau et al., 2012; Guenther, 1952), and its hydrosol at \$17 per liter (Aliksir, 2016). Considering the very low price of bark from sawmill, \$40 per oven dry ton (Browne et al., 2013), even producing only the essential oil from black spruce bark would be worthwhile on an industrial basis (Khan et al., 2014).

In the concept of integrated process, the hot water extract can also be retrieved simultaneously from water distillation. Its high total phenol and tannin contents as well as its antioxidant capacity, especially for WD-DE, makes it a potential natural extract for development of nutraceuticals, cosmetics or food supplements. Furthermore, oligomeric proanthocyanidins could be concentrated by fractionation as is done in Oligopin[®] production from maritime pine bark currently sold around \$50 to \$75 per kg (wholesale price) (EBioChem, 2017). Finally, WD-DE can be regarded as a rich source of *trans*-resveratrol, a molecule reported to have a wide range of nutraceutical and pharmaceutical properties such as anticancer and anti-inflammatory among other (Soleas et al., 2001). Purified *trans*-resveratrol from *Polygonum cuspidatum* root is sold \$500 to \$800 per kg (Bulk Supplements, 2016; Mega Resveratrol, 2013).

5.4. Conclusion

Hot water black spruce bark extracts obtained from both steam and water distillation were determined to have important phenol and proanthocyanidin contents as well as antioxidant capacity. The highest extraction yield was obtained with water distillation process and the WD-DE was determined to have the highest concentration of *trans*-resveratrol. As a result, water distillation of black spruce bark produced simultaneously the essential oil, the hydrosol and a polyphenol-rich hot water extract, especially in *trans*-resveratrol. Furthermore, the

residual bark remaining after application of the integrated process is still available for combustion, as the removal of extractives did not significantly affect its higher heating value. These results represent a part of the ongoing project on the development of the integrated process. Further research is needed to enhance process optimization as well as to contribute to the elucidation of chemical composition of the hot water extracts obtained.

The integrated process represents a new interesting approach to the valorization of black spruce bark, a by-product of wood transformation, and could become applicable to bark of other species. Regarding the difficult economic context in which the forest industry is operating at the moment, this concept of sustainable development can bring new eco-responsible solutions to add value to this forest biomass through production of new high-value products through a biorefinery approach.

Chapitre 6 Optimisation de l'extraction des polyphénols bioactifs de l'écorce de *Picea mariana*

Optimization of Bioactive Polyphenols Extraction from *Picea mariana* Bark

Nellie Francezon, Naamwin-So-Bâwfu Romaric Meda et Tatjana Stevanovic

Article publié dans *Molecules*, 22(12), 2118.

Résumé

Connu pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et non-toxiques, l'extrait à l'eau chaude de l'écorce de *Picea mariana* contient des polyphénols bioactifs d'intérêt. Afin de collecter plus efficacement ces molécules, une optimisation de l'extraction a été réalisée. Les extraits obtenus ont été analysés pour leurs teneurs en différentes familles phytochimiques, et leurs compositions en molécules phénoliques. Il a été démontré que les meilleurs paramètres sont une température basse (80 °C) et rapport écorce/eau faible (50 mg/mL), particulièrement pour l'extraction des polyphénols. Ces derniers ont été identifiés comme étant des monomères de stilbènes : isorhapontine, astringine, resvératrol, isorhapontigénine et picéide, rapporté ici pour la première fois dans *P. mariana*. De plus, deux nouvelles molécules, les picéasides O et P, ont été caractérisées dans cette recherche. Cette étude fournit de nouvelles informations sur l'extraction optimale des polyphénols de l'écorce d'épinette noire, en particulier pour les stilbènes hautement bioactifs dont le *trans*-resvératrol.

Mots-clés : *Picea mariana*, écorce, extraction à l'eau chaude, stilbène, picéaside, chimiométrie

Abstract

Reported for its antioxidant, anti-inflammatory and non-toxicity properties, the hot water extract of *Picea mariana* bark was demonstrated to contain highly valuable bioactive polyphenols. In order to improve the recovery of these molecules, an optimization of the extraction was performed using water. To do so, several extraction parameters were tested and extracts obtained were analyzed both in terms of relative amounts of different phytochemical families and individual molecules quantities. As a result, low temperature (80 °C) and low ratio bark/water (50 mg/mL) were determined to be the best parameters for an efficient polyphenol extraction and that especially for low molecular mass polyphenols. These were identified as stilbene monomers, mainly stilbene glucoside isorhapontin (up to 12.0% of the oven dried extract), astringin (up to 4.6%), resveratrol (up to 0.3%), isorhapontigenin (up to 3.7%) and resveratrol glucoside piceid (up to 3.1%) which is here reported for the first time for *P. mariana*. New stilbene derivatives, piceasides O and P were also characterized herein as new isorhapontin dimers. This study provides novel information about the optimal extraction of polyphenols from black spruce bark, especially for highly bioactive stilbenes including the *trans*-resveratrol.

Keywords: *Picea mariana*, bark, hot water extraction, stilbene, piceaside, chemometrics

6.1. Introduction

Black spruce (*Picea mariana* (Mill.) Britton, Sterns & Poggenb.) is an economically highly appreciated species of the Canadian boreal forest especially for the quality of its wood. Consequently, black spruce bark, a by-product of wood transformation, is available in large quantities. Produced at around 920 000 dry metric tons per year in Québec, spruce bark is mostly burnt to produce energy. However, this biomass rich in bioactive molecules could benefit from new alternative solution for its management. Recently identified in black spruce bark extract (Garcia-Perez et al., 2012), *trans*-resveratrol, which had been studied for its multiple therapeutic properties, was found in our recent study (Francezon & Stevanovic, 2017b) in greater concentration in black spruce bark extract (up to 667 mg/100 g of dry extract), than in common food source such as red wine, grape skin or cocoa (Counet et al., 2006; Wang et al., 2002). Several other active compounds identified in black spruce bark extracts such as taxifolin, pinoresinol, isolariciresinol, mearnsetin, are known for their strong antioxidant and anti-inflammatory properties (Garcia-Perez et al., 2012). Stilbenes phytoalexines isorhapontin, astringin, isorhapontigenin and piceatannol (Manners & Swan, 1971) were reported to be associated with antimicrobial properties, but also for therapeutic potential as antioxidant, cardioprotective, anti-inflammatory and anticancer (Frémont, 2000; Roupe et al., 2006). Easily recoverable through simple water extraction, *trans*-resveratrol and others bioactive polyphenols could become available from black spruce bark feedstock as potential active ingredients for cosmetics, functional foods or pharmaceuticals. Moreover, acute oral toxicity of black spruce bark hot water extract obtained from our laboratory was tested on Sprague-Dawley rats on preliminary *in vivo* trials. With an average median lethal concentration LD₅₀ toxicity greater than 2000 mg/kg, this study concluded that black spruce hot water extract showed no toxicity (Clinical Trial, 2012).

With the growing interest for eco-friendly chemical procedures and very strict food and cosmetics industry regulations, green processes have become of growing interest for natural ingredients extractions (Chémat et al., 2012a). Among green solvents, water is of particular interest as non-toxic, non-flammable, cheap and easily available. Even if water is not the best solvent to extract active polyphenolic molecules, it still possesses remarkably flexible

physico-chemical properties that can be exploited to increase the extraction selectivity (Hartonen & Riekkola, 2017).

Black spruce bark hot water extract has been studied as a new source of bioactive compounds but no research was performed so far to improve their quantity. Taking into account that purification methods are time-consuming and laborious, using rather a more selective extraction represents an interesting approach. Therefore, this study aimed to optimize the hot water extraction of bark, using factorial experimental design and high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint analysis. To the best of our knowledge, this is the first study which explores the potential of chemometric based approach to determine the effects of extraction parameters on individual quantity of selected compounds from black spruce bark extract. The identification and quantification of molecules present in black spruce bark hot water extract helped us evaluate this extract as a potential health product.

6.2. Materials and methods

6.2.1. Plant material

Bark of black spruce was supplied by Boisaco Inc sawmill (Québec, Canada) from debarking of logs. A voucher specimen was deposited at the Herbarium Louis-Marie of the Université Laval, Québec, Canada, with reference number QFA 0358054. In the laboratory, the raw material was separated from wood residues and lichens, washed and then air-dried at ambient temperature for 5 days. Bark was milled and sieved to select particles between 0.5 and 0.25 mm.

6.2.2. Factorial design for multiple extraction experiment

A 3×3×2 factorial experimental design was set up in order to evaluate the relationship between the response factors measured and the extraction variables. The objective was to select the best conditions for extraction optimization. The three independent variables considered were extraction time (60, 90, 120 min), ratio bark/water (200, 100, 50 mg/mL) and temperature (80, 100 °C); response factors measured were extraction yield, amount of

phytochemicals (total phenol content, total proanthocyanidin content, total sugar content) and antioxidant activity.

6.2.3. Extraction procedure for optimization experiment

Air-dried bark (5, 10 and 20 g according to selected ratio) was extracted with 100 mL of hot distilled water under reflux and filtered with a Whatman n°3 filter (Diouf et al., 2009), then 100 mL of water was used to wash the extracted bark. Aqueous filtrate was freeze-dried with a Labconco FreeZone 12 L Console Freeze Drying System (Labconco, Kansas City, MO, USA). Each extraction was performed in duplicate.

6.2.4. Isolation and characterization of the hot water extract constituents

Air dried black spruce bark, 150 g (corresponding to 134 g of oven dried bark) was extracted with 3 L of distilled hot water under reflux for 1h. After filtration with a Whatman n°3 filter paper, the extract was freeze-dried with a Labconco FreeZone 12 L Console Freeze Drying System (Labconco, Kansas City, MO, USA) to yield 14.9 g of dry extract. Black spruce hot water extract powder (11.23 g) was fractionated on a silica column (63-200 µm particle size) using a mixture of methylene chloride/methanol solvents from 10 to 100% methanol. Eight fractions were obtained, from which some compounds were purified in semi-preparative HPLC: Si-1 (102.1 mg) yielded compound **8** (6.1 mg), Si-2 (707.9 mg) for compound **7** (15.3 mg), Si-4 (1222.2 mg) for compounds **4** (27.8 mg) and **5** (67.4 mg), Si-5 (1687.9) for compound **3** (86.4 mg). Fraction Si-6 (1771.7 mg) was further purified on a sephadex column, resulting in 15 sub-fractions. Compounds **1** (9.8 mg) and **2** (13.9 mg) were then isolated from fractions Si-6.1 (99.3 mg) and 6.2 (45.5 mg), and compound **6** (15.4 mg) from Si-6.8 (106.6 mg). Isolation of pure compounds was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) on a semi-preparative Zorbax SB-C18 column (21.2 × 250 mm, 7 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with an Agilent Technologies 1260 Infinity instrument. The flow rate was 10 mL/min of several elution gradients of water/methanol adapted to targeted molecules' polarity. The absorbance was read at 280, 320

and 340 nm with a photodiode array detector. Identification of 8 purified compounds was achieved by compiling information from UV wavelength, mass spectra and NMR shifts.

6.2.5. Phytochemicals assessments of the extracts

6.2.5.1. Total phenol content

Total phenol content was measured for the 36 extracts with the Folin Ciocalteu test according to the method reported by St-Pierre et al. (2013). Extract samples of 500 μL were diluted to a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and reacted with 2.5 mL Folin Ciocalteu reagent (1:10 v/v) and 2.0 mL sodium carbonate aqueous solution (75 g/L) during 10 min in a 50 °C hot bath. The absorbance measured at 760 nm using a UV-visible spectrophotometer Varian Cary50 (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) was used to express the phenol content in terms of gallic acid equivalent (mg GAE/g of dry extract) with a calibration curve obtained for gallic acid ($y = 0.0227x - 0.0083$; $R^2 = 0.9994$).

6.2.5.2. Proanthocyanidin content

Proanthocyanidin content of the 36 extracts was determined by the method described by Porter et al., (1985). Each extract (1 mL, concentration of 480 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was mixed with 200 μL of 2% ferrous ammonium sulfate ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$) in HCl solution (2N), and 6 mL of *n*-butanol:HCl (95:5) and reacted for 50 min in a 95 °C hot bath. Proanthocyanidin content was determined by reading absorbance on a UV-Vis spectrophotometry at 550 nm and expressed with a cyanidin chloride calibration curve ($y = 0.0298x$; $R^2 = 0.9953$), in cyanidin chloride equivalent CyE/g dry extract.

6.2.5.3. Total sugar content

Total sugar content of 36 extracts was determined by the phenol-sulfuric acid method adapted from Albalasmeh et al. (2013). Briefly, 1 mL of extract (90 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was mixed with 500 μL of phenol reagent (4% m/v water) and 2.5 mL of concentrated sulfuric acid (36N) and reacted for 10 min in darkness. Absorbance was read at 490 nm and sugar content was expressed

with an Arabinose-Rhamnose-Galactose-Fructose calibration curve (mg ARGF/g dry extract) ($y = 0.0097x + 0.022$; $R^2 = 0.9960$).

6.2.5.4. DPPH assay

The antioxidant activity of the 36 extracts was evaluated with the radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) using a method adapted from Li et al. (2009). In a 96-well plate, 100 μ L of each diluted extract in methanol (100 μ g/mL) reacted with 150 μ L DPPH (137 μ M). The reduction of the radical resulted in a color change that was recorded after 30 min on a spectrophotometer at 515 nm wavelength. Percentage of DPPH radical inhibition was calculated against a blank and expressed in Trolox Equivalent (μ mol TE/g dry extract) according to the standard curve ($y = 0.0782x + 0.0142$; $R^2 = 0.9785$).

6.2.6. HPLC-DAD analysis

In order to evaluate the influence of the extraction parameters on the monomeric phenolic profile of the extract, the 36 black spruce bark extracts were tested using High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector analysis. The separation was performed on an Agilent Technologies Series 1100 Instrument equipped with a reverse phase Zorbax SB-C18 column (4.6 \times 250 mm, 5 μ m) (Agilent Technologies, USA). The system was run with the following elution program, with solvents (A) 1% (v/v) formic acid in water and (B) acetonitrile: 5-15% B in 10 min, isocratic 15% B for 5 min, 15-30% B in 20 min, isocratic 30% B for 5 min, 30-40% B in 5 min, isocratic 40% B for 5 min. Then, 10 min post run at initial conditions was set for column equilibration. The flow rate was 0.7 mL/min and the column temperature, 30 $^{\circ}$ C. Black spruce extracts were injected at a concentration of 1 mg/mL, 10 μ L injection volume. UV detection was set at 280, 320 and 340 nm.

6.2.7. Chemometric analysis

In order to highlight the variability observed between the 36 studied extracts by HPLC-DAD analyses, the peak areas of main phenolic compounds were then submitted to an exploratory

chemometric analysis. To achieve it, a principal component analysis (PCA) was applied on the dataset made of 36 samples \times 8 variables (major extract constituents) (Meda et al., 2017). The analysis was performed with SAS software package (SAS Institute Inc., Cary, USA).

6.2.8. HRMS and NMR analysis

High Resolution-Mass Spectrometry analyses were performed on a 6210 Time-of-Flight (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with electrospray in positive mode (ESI+), coupled with HPLC. The ESI-TOF specifications were as follow : drying gas, 5 L/min; gas temperature, 325 °C; nebulizer pressure, 30 psig; skimmer, 65 V; capillary voltage, 4000 V and fragmentor, 175 V. Recorded from 100 to 1000 m/z , mass spectra were then analyzed on an Agilent MassHunter Qualitative Analysis software (version B.02.00, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Nuclear magnetic resonance (NMR) was performed on an Agilent 400-MR DD2 system, either for one-dimensional ^1H and ^{13}C NMR or two-dimensional NMR (HSQC, HMBC, COSY, NOESY and ROESY) spectroscopy. NMR shifts of isolated compounds were in accordance with literature: **1** and **2** (Struijs et al., 2007); **3**, **4**, **5** and **8** (Mulat et al., 2014), **7** (Commodari et al., 2005) (Annexe 2).

Compound **6** was isolated as a dark yellow amorphous solid (15.4 mg); $[\alpha]_D^{22}$ -52.0° ($c = 0.25$, CH_3OH); UV (CH_3OH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 285 (4.5), 310 (4.7), 330 (4.7) nm; Infrared IR (Attenuated total reflection ATR) : 3349, 2950, 2837, 1452, 1414, 1125, 1026, 984, 667 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz), ^{13}C NMR (CD_3OD , 126 MHz), HMBC: see Table 6.3; Positive ESI-TOF-HRMS, m/z : 856.3026 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$, calculated exact mass 838.2684 for $\text{C}_{42}\text{H}_{46}\text{O}_{18}$.

6.2.9. Statistical analysis

Yield, polyphenol, proanthocyanidin, sugar and antioxidant capacity assessments were expressed as means of triplicates \pm standard deviation. Data sets were submitted to factorial analysis of variance (ANOVA), and contrast analysis (planned comparisons) using SAS software (SAS Institute Inc, NC, Cary, USA).

6.3. Results and discussion

6.3.1. Effects of extraction parameters on multiple response factors

Multiple response factors (Table 6.1) were evaluated in this factorial design in order to understand how they were affected by extraction parameters. Factorial analysis of variance (ANOVA) was performed on the yield, the total phenolic content, total sugar content, total proanthocyanidin content and antioxidant activity of the 18 different extracts in duplicates. As for significant results, contrasts analysis was conducted in order to determine the main influencing parameter.

Table 6.1. Factorial design for the optimization of black spruce bark extraction.

Experimental design				Response factors				
Extract name	Time (min)	Temperature (°C)	Ratio (mg/mL)	Yield (%)	Phen (mg GAE/g)	PA (mg CyE/g)	Sugar (mg ARGF/g)	Antiox (μmol TE/g)
A	60	80	200	11.3 ± 0.4	442 ± 25	224 ± 8	662 ± 77	1021 ± 54
B	60	100	200	14.3 ± 0.7	471 ± 6	252 ± 2	581 ± 3	1082 ± 29
C	60	80	100	14.5 ± 0.4	469 ± 5	236 ± 15	543 ± 49	1087 ± 19
D	60	100	100	17.7 ± 0.3	472 ± 27	254 ± 8	574 ± 7	1071 ± 14
E	60	80	50	15.6 ± 0.5	485 ± 4	252 ± 16	604 ± 24	1007 ± 101
F	60	100	50	19.3 ± 0.2	468 ± 2	264 ± 1	556 ± 21	1091 ± 6
G	90	80	200	11.5 ± 0.5	456 ± 5	245 ± 1	608 ± 71	1029 ± 52
H	90	100	200	14.6 ± 0.2	426 ± 15	232 ± 20	600 ± 13	1017 ± 64
I	90	80	100	14.5 ± 0.3	486 ± 19	249 ± 14	606 ± 9	1079 ± 9
J	90	100	100	18.1 ± 0.4	438 ± 3	232 ± 1	555 ± 25	1047 ± 30
K	90	80	50	16.1 ± 0.2	472 ± 3	246 ± 34	538 ± 24	1061 ± 11
L	90	100	50	19.4 ± 0.6	459 ± 10	243 ± 3	573 ± 37	991 ± 56
M	120	80	200	11.2 ± 0.2	464 ± 45	245 ± 3	571 ± 23	901 ± 174
N	120	100	200	14.7 ± 0.3	399 ± 9	220 ± 15	637 ± 4	1026 ± 62
O	120	80	100	15.1 ± 0.4	467 ± 35	235 ± 15	617 ± 21	962 ± 87
P	120	100	100	18.8 ± 0.4	447 ± 1	238 ± 4	673 ± 6	1049 ± 27
Q	120	80	50	16.5 ± 0.1	445 ± 5	244 ± 6	579 ± 7	1086 ± 17
R	120	100	50	20.1 ± 0.7	502 ± 56	236 ± 17	534 ± 11	1075 ± 20

Response factor results are expressed as means and standard deviations from extracts in duplicates. Statistical analysis (factorial analysis of variance (ANOVA) and contrasts) are available in Table S1 Annex 1. Phen: total phenol content; PA: Proanthocyanidin content; Antiox: Antioxidant capacity; GAE: Gallic Acid Equivalent; CyE: Cyanidin Equivalent; ARGF: Arabinose-Rhamnose-Galactose-Fructose equivalent; TE: Trolox Equivalent; Results are expressed on g of dry extract.

6.3.1.1. Extractable matter yields

Highly significant in the ANOVA analysis, the extraction yield is the most affected among response factors. Indeed, its value may double (from $11.2 \pm 0.2\%$ to $20.1 \pm 0.7\%$) depending on the extraction parameters applied. The yield is one of the most important factor studied during optimization of the extraction because it determines the effectiveness of a process. In order to understand which parameters are influencing, further statistical analysis, simple contrasts, were performed (Table S1 Annex 1). The temperature and the ratio (bark/solvent) were demonstrated to highly affect the yield with a p -value below 5%. As previously reported in literature for yet another bark extraction (Geoffroy et al., 2017), the yield is inversely proportional to the ratio (Table 6.1). The less the bark the larger contact area between the solvent and the raw material which decreases consequently saturation of water with extracted compounds. As for extraction temperature, applying $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ instead of $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ globally resulted in 3% increase of yields. Thus, ratio 50 mg/mL and $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperature have been considered and adopted as the best parameters for an optimized yield.

6.3.1.2. Phenolic, proanthocyanidin contents and antioxidant capacity

As reported in multiple studies, softwood barks are very rich source of phenolic compounds, known for their health benefits (Royer et al., 2013; Stevanovic et al., 2009). An estimation of the total phenolic content was measured with the Folin-Ciocalteu colorimetric test, a fast and easy method, notably adapted to screening between extracts. Results demonstrated quite high polyphenol rate in black spruce bark extract, varying between $399 \pm 9\text{ mg GAE/g}$ to $502 \pm 56\text{ mg GAE/g}$, in accordance with previously reported studies on black spruce bark (Garcia-Perez et al., 2010; Royer et al., 2013). These results had significant differences at $p < 5\%$ according to ANOVA, and simple contrasts revealed that the ratio was the influencing parameter (Table S1 Annex 1). The lower the ratio, the higher the total phenol content (Table 6.1). Thus, the extraction of phenolic compounds is enhanced by the decrease of ratio. However, among phenolic compounds, the water-soluble condensed tannins (proanthocyanidins) seemed to be unaffected by extraction optimization. Results obtained for the screening of the 36 extracts on proanthocyanidin content using acidic butanol assay were relatively constant around $242 \pm 6\% \text{ mg CyE/g}$ of dry extract (Table 6.1). Indeed, no

significant differences between the 18 extraction parameter combinations was reported on the ANOVA (Table S1 Annex 1). Thus, as polymeric phenolic compounds showed stable quantities, it seemed highly relevant to further study the variation of low molecular mass phenolic compounds in black spruce bark factorial design extraction.

Previous studies on black spruce bark hot water extract have demonstrated its important antioxidant activity (Garcia-Perez et al., 2010). Free radical scavenging activity using DPPH was screened on the 36 different extracts but no significant difference was determined according to ANOVA (Table S1 Annex 1). With very high values from 901 ± 174 to 1091 ± 6 $\mu\text{mol TE/g}$ dry extract, not only antioxidant activity equaled commercially available Oligopin's (1056 ± 79 $\mu\text{mol TE/g}$ dry extract) (Francezon & Stevanovic, 2017b) but it has also been preserved regardless of the extraction parameters applied.

6.3.1.3. Other phytochemicals

The composition of the hot water extract of black spruce bark in terms of nitrogen and sugars contents were also investigated. Nitrogen contents in black spruce bark, which could be either from proteins or alkaloids (Schneider et al., 1991), was found to be very low, around $0.24 \pm 0.04\%$ of total dry extract (data not shown). Thus, no further analysis was performed. On the other hand, soluble sugars are important constituents of spruce bark, either as free sugars or part of glycosides when linked to molecules such as polyphenols. Thus, stilbene glycosides content was reported to reach 10% of spruce bark *Picea abies* dry extract, accounting therefore for an important amount of total sugars (Kemppainen et al., 2014). Carbohydrates from spruce bark were reported to be mainly represented by glucose, mannose, galacturonic acid, glucuronic acid and galactose (Kemppainen et al., 2014). Approximate analysis of sugar content in natural extracts can be determined using the phenol-sulfuric acid method, which takes into account non-cellulosic bonded and free saccharides. In black spruce bark extracts, sugar content was determined from 534 ± 11 to 673 ± 6 mg ARGF/g dry extract (Table 6.1), which represents important amount. As ANOVA confirmed significant differences between the extracts, simple contrasts were conducted and revealed that ratio was once again the most influential extraction parameter (Table S1 Annex 1). As a matter of facts, higher ratio (200 mg/mL) appeared to be more favorable to sugar extraction (Table 6.1), as previously reported

(Giannoccaro et al., 2006). Interestingly, the higher the sugar content, the lower the total phenol content. This observation could be related to the greater affinity of sugar with hot water than that of less polar polyphenols (Elleuch et al., 2011). Thus, a high ratio resulted in quick water saturation with carbohydrates, leaving behind the extraction of polyphenols.

6.3.2. HPLC fingerprint and chemometric analysis of black spruce bark extract low molecular weight phenolic compounds

Fingerprint analysis with HPLC-DAD has been a method of choice for quality test or to determine the origin of herbal drugs and products (Xu et al., 2010). In those applications, low molecular weight phenolic compounds were considered efficient descriptors of some of the product's features, often based on polyphenolic characteristic chemical profiles (Meda et al., 2017). Stilbene compounds can be considered chemotaxonomic features of *Picea* species. Taking into account that their maxima of absorption is around 320 nm, this wavelength was chosen for further analysis of chromatographic profiles by chemometric analysis.

HPLC phenolic profiles of the 36 extracts are quite similar with slight quantitative differences (Figure 6.1.). The targeted 8 main peaks exhibit essentially the same pattern in terms of concentration proportions. Hence, a chemometric analysis was performed using Principal Component Analysis (PCA) to highlight the variability of phenolic composition as a function of the extraction parameters used. PCA is a powerful tool and probably the most frequently used chemometric technique for analyzing complex multivariate measurements in chemistry. In PCA, the most important information of the dataset are condensed into synthetic linear combinations of the variables called Principal Components (PC). Their graphical representations, the component pattern and the scores plot, contribute to a better understanding and visualization of the multidimensional dataset they summarized (Meda et al., 2017).

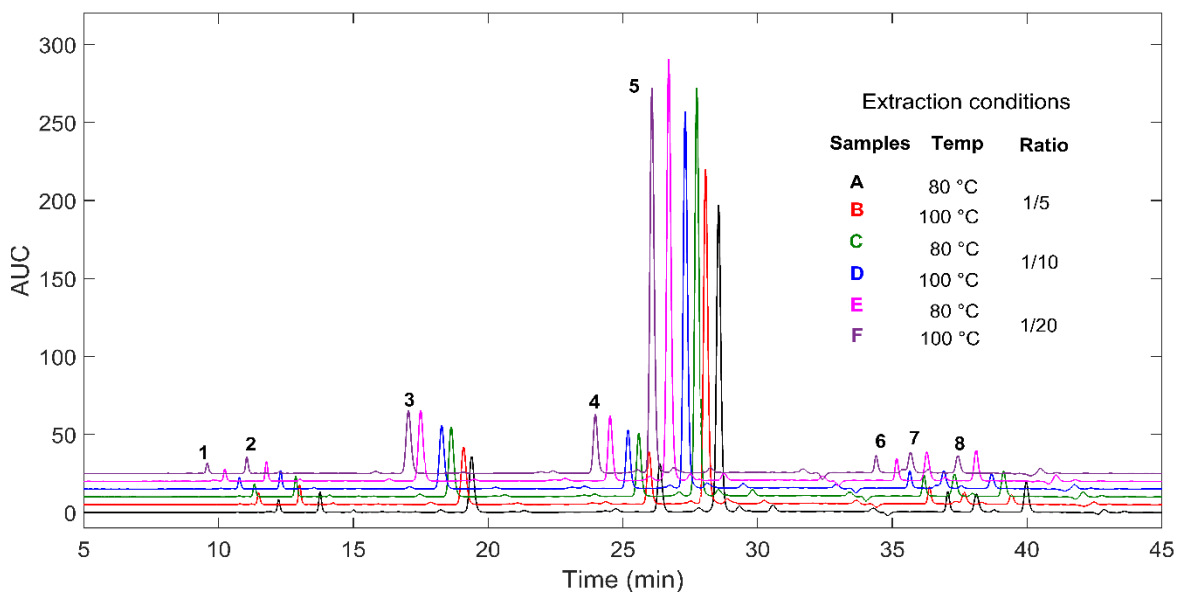


Figure 6.1. Superposed chromatogram profiles of some of the 36 extracts.

The explorative analysis of the 8 main monomeric compounds relative amounts in the 36 extracts revealed that the first three principal components PC1 (49.9%), PC2 (28.5%) and PC3 (8.2%) explained 86.7% of the total variance, which is highly representative of the model (Figure S1 Annex 1). Correlation analysis (Table S2 Annex 1) revealed that compounds **1** and **2** were highly correlated with PC2 (respective correlation coefficient of 0.96 and 0.93) and compounds **4**, **5**, **7** and **8** with PC1 (respective correlation coefficient 0.86, 0.89, 0.87, 0.81). The correlation circle (Figure 6.2A) which illustrate the variables according to the PCs, confirmed the high correlation of the compounds to both of the PCs. Compounds **3** and **6** were less explicative of the model as they were not well projected on the PCs. None of the compounds was correlated with PC3, thereby, only PC1 and PC2 (which represents 78.4 % of the total variance) were retained for the analysis. The score plot (Figure 6.2B) which represents the distribution of the extracts according to the PC1 and PC2, revealed a division tendency of two groups as a function of temperature. Extracts produced at 80 °C seemed to gather in the upper right part (with positive coordinates for PC1 and PC2) and 100 °C extracts in the lower left part (with negative coordinates).

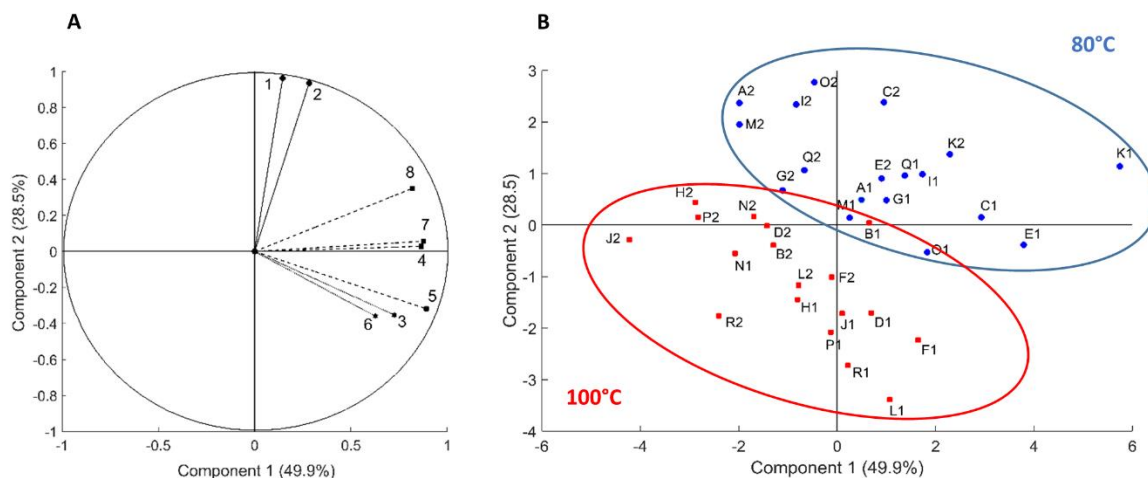


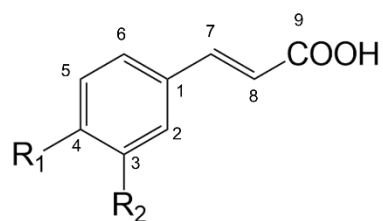
Figure 6.2. Principal component analysis of the 36 extracts of black spruce bark; (A) Correlation circle which displays the 8 targeted molecules correlations on the two principal components (axes); (B) Score plot of the 36 extracts (A1 to R2) in function of the two principal components.

Moreover, the sum of variables 1 and 2 is even more correlated to PC2 than the components taken individually. As a matter of fact, compounds **1** and **2** can be gathered into a group of molecules, group A. This also applies to compounds **4**, **5**, **7** and **8** with PC1, therefore they will be considered as another group, group B. The 80 °C extracts are mostly congregated according to group A and B direction. Considering the values of the projections of the 80 °C extracts on PC1, they all demonstrated positive coordinates which means that the 80 °C extracts concentrated higher quantities of A and B groups than the extracts obtained at 100 °C.

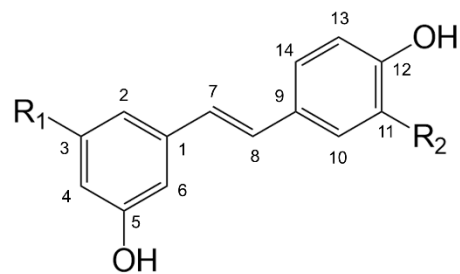
Despite the fact that none of the extraction parameters seemed suitable to preferentially extract selected compounds from the others, PCAs, representing 76.4% of the model, allowed to highlight two groups of compounds which seemed to have the same tendencies and which were both influenced by the extraction temperature. In order to support this conclusion, the 8 compounds needed to be identified.

6.3.3. Isolation, identification and quantification of low molecular weight phenolic constituents of black spruce bark extract

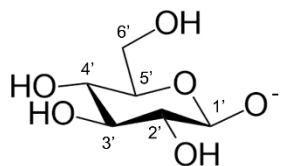
The eight targeted phenolic compounds were therefore purified using silica and sephadex open columns and semi-preparative chromatography. Their characterization was achieved using a combination of ultraviolet (UV) profiles, mass spectra and nuclear magnetic resonance (NMR) shifts (Table 6.2). Compounds of group A were found to be glycosylated hydroxycinnamic acids, namely *trans-p*-coumaric acid β -D-glucopyranoside (**1**) and *trans*-ferulic acid β -D-glucopyranoside (**2**) (Figure 6.3). Their glucose moiety was confirmed to be linked to carbon 4 (position *para*) by nuclear overhauser spectroscopy (NOESY) analysis. The *trans-p*-coumaric acid, the *trans*-ferulic acid and their glycosides were previously reported in *Picea mariana* and other *Picea* species (Garcia-Perez et al., 2012; Pan & Lundgren, 1995). However, this is the first time that glucose-bound coumaric and ferulic acids (**1**) and (**2**) are reported in *Picea mariana*. Interestingly, several studies referred to these hydroxycinnamic acids as widely distributed among gymnosperms as bound to cell-wall (Carnachan & Harris, 2000). As for the group B compounds, they are all stilbene derivatives. Molecules **4** and **5** were determined to be stilbene glycosides *trans*-piceid (**4**) and *trans*-isorhapontin (**5**) (Figure 6.3). To the best of our knowledge, this is the first time that *trans*-piceid was reported in *P. mariana*. Their aglycons are identified as *trans*-resveratrol (**7**) and *trans*-isorhapontigenin (**8**) (Figure 6.3). Even if not included in group B, compound **3** is a member of the stilbene family, identified as *trans*-astringin, a piceatannol glucoside (Figure 6.3).



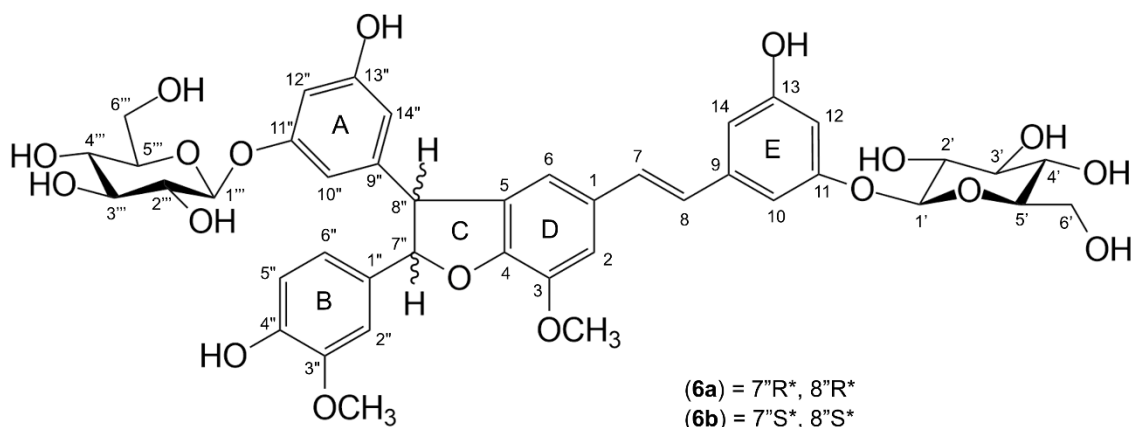
- (1) $R_1 = \text{OGlu}; R_2 = \text{H}$
 (2) $R_1 = \text{OGlu}; R_2 = \text{OCH}_3$



- (3) $R_1 = \text{OGlu}; R_2 = \text{OH}$
 (4) $R_1 = \text{OGlu}; R_2 = \text{H}$
 (5) $R_1 = \text{OGlu}; R_2 = \text{OCH}_3$
 (7) $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$
 (8) $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OCH}_3$



OGlu : Glucose moiety



- (6a) = 7''R*, 8''R*
 (6b) = 7''S*, 8''S*

Figure 6.3. Structures of the molecules isolated from black spruce hot water extract.

Table 6.2. Identification and quantification data for the eight phenolic compounds isolated from black spruce bark extract.

Comp.	Ret. time (min)	Identification				Quantification					
		λ_{\max} (nm)	Exact mass	Formula	Suggested compound	Regression equation	R^2	Linear range ug/ml	LOD	LOQ	Concentration range mg/100g dry extracts
1	12.4	290	326.0994	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	<i>trans-p</i> -coumaric acid β -D-glucopyranoside	$y = 2140.2x + 8.2609$	0.9997	5-500	0.1	0.4	160 - 265
2	13.9	290, 315	356.1093	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	<i>trans</i> -ferulic acid β -D-glucopyranoside	$y = 1486.4x - 60.765$	0.9987	5-1000	0.4	1.3	894 - 1073
3	20.2	325, 305	406.1243	C ₂₀ H ₂₁ O ₉	<i>trans</i> -astringin	$y = 2284x - 441.91$	0.999	5-1000	3.8	11.4	2272 - 4613
4	26.8	305, 320	390.1303	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	<i>trans</i> -piceid	$y = 3384.1x - 528.13$	0.9971	5-500	0.2	0.6	1805 - 3094
5	29.4	325, 303, 290	420.1416	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	<i>trans</i> -isorhapontin	$y = 2944.6x - 265.82$	0.9979	1-1000	0.6	1.9	4256 - 11971
6	37.3	330, 310, 283	838.2684	C ₄₂ H ₄₆ O ₁₈	piceasides O and P	$y = 1056.4x - 329.29$	0.9933	10-1000	0.4	1.2	3508 - 4853
7	38.5	305, 320	228.0796	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	<i>trans</i> -resveratrol	$y = 7520.7x + 43.49$	0.9914	1-500	0.2	0.6	53 - 302
8	40.3	325, 303, 290	258.0892	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	<i>trans</i> -isorhapontigenin	$y = 2062.4x - 415.08$	0.9979	5-1000	0.3	0.9	2257 - 3654

Comp.: compound number; Ret. time : retention time; λ_{\max} : maximal wavelength value; Exact mass calculated from m/z ; R^2 : coefficient of determination; LOD : Limit of detection, LOQ : Limit of quantification.

As for the compound **6**, no match for its molar mass was found in the literature, hence further analysis were performed. Positive ESI-TOF-HRMS showed a unique $[M+NH_4]^+$ ion peak at $m/z = 856.3026$ (originally calculated exact mass = 838.2684) from which was generated the molecular formula $C_{42}H_{46}O_{18}$. High molar mass molecules from *Picea abies* had been previously reported in the literature as stilbene dimers, named piceasides (Gabaston et al., 2017; Li et al., 2008). To date, fourteen piceasides (A to N) had been identified, but none of them corresponded to a molecular mass of 838. Therefore, structural elucidation of **6** was performed using 1D (1H , ^{13}C) and 2D (HMBC, HSQC, ROESY, and COSY) NMR analyses. Interestingly, the ^{13}C NMR spectrum displayed signals in doublet (Table 6.3), which is characteristic of a mix of stereoisomers such as diastereoisomers. Moreover, 1H NMR spectrum showed two sets of signals overlapped or partially overlapped, confirming the diastereoisomers hypothesis as previously demonstrated for *Picea abies* stilbene dimers by Li et al. (2008). A careful assignment of NMR shifts signals for both **6a** and **6b** is presented in details in Table 6.3 and confirmed with literature (Gabaston et al., 2017; Li et al., 2008). The aromatic area of the spectrum was composed of two overlapped olefinic protons [**6a** and **6b**: δ_H 7.03 (H7), 6.87 (H8)] with 16 Hz characteristic coupling constants of a *trans*-substituted double bond and four aromatic rings : two totally overlapping ABC spin system of each **6a** and **6b** 1,3,4-trisubstituted phenyl rings (ring B) [δ_H 6.93 (H2''), 6.80 (H6''), 6.79 (H5'')], two partially overlapping ABC spin system of 1,3,5-trisubstituted phenyl rings (ring A) [**6a**: δ_H 6.42 (H10''), 6.50 (H12''), 6.34 (H14''), **6b**: δ_H 6.42 (H10''), 6.50 (H12''), 6.31 (H14'')], two overlapping ABC spin system of each **6a** and **6b** 1,3,5-trisubstituted phenyl rings (ring E) [δ_H 6.78 (H10), 6.45 (H12), 6.62 (H14)] and two overlapping AM system of **6a** and **6b** 1,3,4,5-tetrasubstituted phenyl rings (ring D) [δ_H 7.11 (H2), 6.83 (H6)] (Figure 6.3). Spectrum area between δ_H 5.5 and 4.4 displayed partially overlapping AX spin system of two dehydrobenzofuran moieties (ring C) [**6a**: δ_H 5.43 (H7''), 4.51 (H8''), **6b**: δ_H 5.44 (H7''), 4.50 (H8'')] and protons at anomeric carbons of glucose moieties [**6a**: δ_H 4.87 (H1'), 4.79 (H1''), **6b**: 4.87 (H1'), 4.90 (H1'')]. Finally, the area between δ_H 3.93-3.31 with overall overlapping signals indicated the presence of 4 glucose moieties, two for each diastereoisomers, and two overlapping signals integrating for 6H each, characteristic of methoxyl groups. [**6a**: δ_H 3.95 (OCH₃), 3.82 (OCH₃''), **6b**: 3.95 (OCH₃), 3.81 (OCH₃'')]. HMBC spectrum analysis confirmed their position, linked respectively to C-3 and C-3''.

Compounds **6a** and **6b** were therefore determined to be stilbene dimers resulting from the linkage of two isorhapontin molecules, confirmed by the occurrence of 4 methoxyl groups (2 for each diastereoisomer) (Figure 6.3). Then, the only difference between the two diastereoisomers was their absolute stereochemistry on the two chiral carbons C-7'' and C-8''. *trans* position of H7'' and H8'' was determined analyzing the growth rates of ROESY peaks, as a function of the mixing time from 100 ms to 400 ms acquired spectrum, leading to **6a** (7'' R*, 8''R*) and **6b** (7'' S*, 8''S*) stereochemistry. To the best of our knowledge, this is the first time that diastereoisomeric isorhapontin dimers are reported from the plant in the literature. So far, identified piceasides reported in literature are mainly dimerization products of monomeric glycosylated stilbenes astringin and isorhapontin (Gabaston et al., 2017; Li et al., 2008). Different stilbene dimers had also been reported from other genera, such as *Gnetum* and *Vitis* (Huang et al., 2000; Waffo-Téguo et al., 2001b; Yao & Lin, 2005). In the continuation of *Picea* spp. isolated stilbene dimers denomination, compounds **6a** and **6b** will therefore be named piceasides O and P respectively.

Table 6.3. NMR shifts of isolated molecule **6** from black spruce bark hot water extract ^1H and ^{13}C shifts and HMBC correlations of **6a** and **6b** molecules.

Position	δ_{H} (6a) ^a	δ_{C} (6a) ^b	δ_{H} (6b) ^a	δ_{C} (6b) ^b	HMBC (6a and 6b)
1		139.7 (<i>d</i>)		139.7 (<i>d</i>)	
2	7.11 (<i>br s</i>)	110.5 (<i>d</i>)	7.11 (<i>br s</i>)	110.4 (<i>d</i>)	C-3, 7, 6, 4
3		144.3 (<i>s</i>)		144.3 (<i>s</i>)	
4		148.0 (<i>d</i>)		148.0 (<i>d</i>)	
5		131.5 (<i>d</i>)		131.5 (<i>d</i>)	
6	6.83 (<i>br s</i>)	115.6 (<i>d</i>)	6.81 (<i>br s</i>)	115.5 (<i>d</i>)	
7	7.03 (<i>d</i> , 16.3)	128.6 (<i>d</i>)	7.03 (<i>d</i> , 16.3)	128.6 (<i>d</i>)	C-8, 1, 2, 6
8	6.87 (<i>d</i> , 16)	126.2 (<i>d</i>)	6.87 (<i>d</i> , 16)	126.2 (<i>d</i>)	C-7, 9, 1, 10, 14
9		131.9 (<i>d</i>)		131.8 (<i>d</i>)	
10	6.78 (<i>overlap</i>)	105.7 (<i>d</i>)	6.78 (<i>overlap</i>)	105.6 (<i>d</i>)	C-11, 8, 9, 12, 14
11		159.0 (<i>s</i>)		159.0 (<i>s</i>)	
12	6.45 (<i>t</i> , 2.2)	102.9 (<i>s</i>)	6.45 (<i>t</i> , 2.2)	102.9 (<i>s</i>)	C-10, 14, 13, 11
13		158.1 (<i>s</i>)		158.1 (<i>s</i>)	
14	6.62 (<i>t</i> , 1.7)	107.0 (<i>s</i>)	6.62 (<i>t</i> , 1.7)	107.0 (<i>s</i>)	C-13, 12, 8, 10
1'	4.87 (<i>overlap</i>)	100.4 (<i>s</i>)	4.87 (<i>overlap</i>)	100.4 (<i>s</i>)	C-11
2'	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	73.3 (<i>d</i>)	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	73.4 (<i>d</i>)	
3'	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	76.5 (<i>s</i>)	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	76.5 (<i>s</i>)	
4'	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	70.0 (<i>d</i>)	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	70.0 (<i>d</i>)	
5'	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	76.6 (<i>d</i>)	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	76.6 (<i>d</i>)	
6'	3.79 (<i>dd</i> , 12.1, 2.3)	60.9 (<i>d</i>)	3.79 (<i>dd</i> , 12.1, 2.3)	60.7 (<i>d</i>)	C-4', 5'
1''		131.6 (<i>d</i>)		131.6 (<i>d</i>)	
2''	6.93 (<i>d</i> , 6.9)	109.4 (<i>d</i>)	6.93 (<i>d</i> , 6.9)	109.3 (<i>d</i>)	C-6'', 4'', 7'', 3'' 1''
3''		147.7 (<i>s</i>)		147.7 (<i>s</i>)	
4''		146.5 (<i>d</i>)		146.5 (<i>d</i>)	
5''	6.79 (<i>overlap</i>)	114.8 (<i>s</i>)	6.79 (<i>overlap</i>)	114.8 (<i>s</i>)	C-1'', 3''
6''	6.80 (<i>overlap</i>)	119.0 (<i>d</i>)	6.80 (<i>overlap</i>)	118.8 (<i>d</i>)	C-7'', 1''
7''	5.43 (<i>d</i> , 8.8)	94.0 (<i>d</i>)	5.44 (<i>d</i> , 8.6)	94.0 (<i>d</i>)	C-8'', 2'', 6'', 1'', 3'', 9''
8''	4.51 (<i>d</i> , 8.8)	57.6 (<i>d</i>)	4.50 (<i>d</i> , 8.6)	57.6 (<i>d</i>)	C-7'', 9'', 5, 10'', 14''
9''		143.8 (<i>d</i>)		143.6 (<i>d</i>)	
10''	6.42 (<i>ddd</i> , 3.8, 2.2, 1.5)	107.6 (<i>d</i>)	6.42 (<i>ddd</i> , 3.8, 2.2, 1.5)	107.4 (<i>d</i>)	C-11'', 12'', 8'', 14'', 9''
11''		159.1 (<i>s</i>)		159.1 (<i>s</i>)	
12''	6.50 (<i>t</i> , 2.2)	102.5 (<i>d</i>)	6.50 (<i>t</i> , 2.2)	102.3 (<i>d</i>)	C-13'', 11'', 10'', 14''
13''		158.5 (<i>d</i>)		158.5 (<i>d</i>)	
14''	6.34 (<i>dd</i> , 2.2, 1.4)	109.0 (<i>d</i>)	6.31 (<i>dd</i> , 2.2, 1.4)	108.9 (<i>d</i>)	C-13'', 12'', 10'', 8''
1'''	4.79 (<i>d</i> , 7.5)	100.8 (<i>d</i>)	4.90 (<i>d</i> , 7.6)	100.9 (<i>d</i>)	C-11'''
2'''	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	73.5 (<i>s</i>)	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	73.5 (<i>s</i>)	
3'''	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	76.5 (<i>d</i>)	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	76.5 (<i>d</i>)	
4'''	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	69.7 (<i>d</i>)	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	69.6 (<i>d</i>)	
5'''	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	76.8 (<i>d</i>)	3.37-3.51 (<i>overlap</i>)	76.8 (<i>d</i>)	
6'''	3.93 (<i>dd</i> , 12.1, 2.1)	61.2 (<i>d</i>)	3.91 (<i>dd</i> , 12.1, 2.1)	61.2 (<i>d</i>)	C-4'', 5''
OCH3	3.95 (<i>s</i>)	55.4 (<i>s</i>)	3.95 (<i>s</i>)	55.4 (<i>s</i>)	C-3
OCH3''	3.82 (<i>s</i>)	55.0 (<i>d</i>)	3.81 (<i>s</i>)	50.0 (<i>d</i>)	C-3''

Notes: a : ^1H chemical shifts acquired at 500 MHz in CD_3OD with multiplicities and coupling constants expressed in Hz in parenthesis. b: ^{13}C chemicals shifts acquired at 125 MHz in CD_3OD with multiplicities in parenthesis. Identical chemical shifts for **6a** and **6b** might be interchangeable.

Stilbenes are represented in limited plant genera in nature and their distribution is very genus-specific (Rivière et al., 2012). Stilbenes are widely represented in *Picea* spp. This is particularly the case with the glucosides *trans*-astringin, *trans*-isorhapontin and *trans*-piceid which had been reported in several studies on chemical composition of bark extracts of *Picea* species (Manners and Swan, 1971; Mannila and Talvitie, 1992). While *trans*-resveratrol was identified in several very different plants, from cocoa to grapes and also Asian herbal medicine *Polygonum cuspidatum*, *trans*-isorhapontin which is almost ubiquitous in *Picea* spp. was reported in only two species outside of *Picea* genus : the flowering plants *Veratrum taliense* and *Rheum undulatum* (Rivière et al., 2012). The absence of *trans*-isorhapontin in dietary source of stilbenoids such as wine, berries and vegetables led to very poor investigation on its potential biological activity. Indeed, except an *in vitro* antileukemic activity reported by Mannila and Talvitie (1992), no other pharmacological study was conducted on *trans*-isorhapontin. However, with the recent identification of *trans*-isorhapontin's aglycon, *trans*-isorhapontingenin in a traditional Chinese herbal medicine, *Gnetum cleistostachyum* with anti-cancer effects (Yao et al., 2003), several studies had since been performed on the potential anti-cancer activity of this molecule (Liang et al., 2016). There are also studies on its activities such as cardioprotective (Li et al., 2005) and antioxidant (Fang & Liu, 2002). We report here the *Picea mariana* bark extract as a rich source of these two compounds, the *trans*-isorhapontin reaching the concentration of 11971 mg /100 g of dry extract (12.0% of the total extract) and its aglycon 3654 mg /100 g dry extract (3.7%) (Table 6.2). The abundance of these methoxylated stilbenes in the extract confirm the methoxylation pattern of *Picea mariana* bark polyphenols revealed previously by our group for its proanthocyanidins (Diouf et al., 2013).

Pharmacological interests had risen for piceatannol since it was demonstrated to exhibit anticancer properties (Waffo-Téguo et al., 2001a), supposedly superior to *trans*-resveratrol (Piotrowska et al., 2012). Very few studies considered its glucoside derivative, *trans*-astringin, for which a similar chemopreventive activity was demonstrated (Waffo-Téguo et al., 2001a). We found high contents of *trans*-astringin in black spruce bark extract, the maximum being 4613 mg /100 g of dry extract (4.6%) (Table 6.2). As for the most well-known stilbene, *trans*-resveratrol, multiple researches reported anticancer, anti-inflammatory, anti-hyperlipidemic and cardioprotective activities. Previously identified and

quantified in ethyl acetate fraction of *P. mariana* bark extract (Garcia-Perez et al., 2012), we are reporting here a high content of *trans*-resveratrol in the crude water extract from the optimized extraction at 302 mg/100 g of dry extract representing 0.3% of the dry bark. In addition, we determined in this study for the first time, the presence of *trans*-piceid in high concentration in *Picea mariana* bark extract reaching a maximum of 3094 mg/100 g of dry extract. Less studied than its aglycon resveratrol, *trans*-piceid is nonetheless very interesting from a pharmacological point of view as therapeutic properties were reported, namely anticancer, cardioprotective, anti-inflammatory (Du et al., 2013) and even for the treatment of Parkinson disease (Chen et al., 2015b).

6.4. Conclusion

We have demonstrated in this research that the chemical composition of hot water extracts of black spruce bark was affected by extraction parameters. Proportion of different families of molecules can be preferentially targeted using different extraction parameters. Thus, the recovery of phenolic compounds is favored over sugars when a low ratio (bark/water) is applied. However, high temperatures are not favorable towards extracting the phenolic compounds of interest, while they are advantageous to getting high yields. Hence, for an overall optimized extraction of polyphenols from black spruce bark, the most suitable parameters are 80 °C and ratio 50 mg/mL. Moreover, chemometric analysis demonstrated that specific phenolic compounds classes (hydroxycinnamic acids and stilbenes) can be targeted by selected extraction parameters. Even if none of the extraction parameters allowed to classes discrimination, the 80 °C temperature was confirmed to be the best temperature parameter for extraction of polyphenols. The chemometrics still represents an efficient tool to examine the influence of extraction parameters.

In addition, the great amounts of bioactive resveratrol and stilbenes' glycosides, such as astringin and isorhapontin, which make about a quarter of the whole extract composition, may indicate a potential of application of this extract as natural health product. The presence of piceid, resveratrol glycoside is herein reported for the first time in *Picea mariana*. In addition, the identification of novel diastereoisomeric piceasides, a first occurrence of

isorhapontin dimerization in nature, demonstrated that works need to be pursued on chemical characterization of black spruce bark extract. The repeatability of the chemical composition of the studied 36 crude hot water extracts from *Picea mariana* bark, combined with its previously determined safety, makes this extract applicable as natural health product in food additives, functional foods, cosmetic ingredients and pharmaceuticals.

Chapitre 7 Conclusions et perspectives

7.1. Conclusions

Dans l'optique de trouver de nouvelles alternatives d'utilisation de la ressource forestière, cette thèse de doctorat a exploré la valorisation de l'écorce de l'épinette noire.

Exploitant les propriétés physico-chimiques des différentes familles de molécules extractibles de l'écorce, le développement du procédé intégré a permis d'envisager une valorisation complète de la matière première. Le procédé intégré produit trois extraits naturels à partir de l'écorce par hydrodistillation: l'huile essentielle, l'hydrolat et l'extrait aqueux, tout en conservant le pouvoir calorifique de l'écorce résiduelle pour son application courante, la production d'énergie. Deux techniques classiques d'hydrodistillation ont été testées et comparées : l'entraînement à la vapeur et la distillation à l'eau.

Dans un premier temps, l'étude des huiles essentielles produites a révélé une composition riche en monoterpènes, notamment en α - et β -pinènes et une fragrance très proche de l'odeur naturelle dégagée par les écorces. L'absence d'acétate de bornyle, molécule majoritaire de l'huile essentielle d'aiguille d'épinette noire produite commercialement, permet de considérer l'huile essentielle d'écorce comme un produit différent, que ce soit d'un point vue chimique ou olfactif. L'hydrolat, deuxième extrait aromatique produit pendant l'hydrodistillation, contient principalement des monoterpènes oxygénés, notamment l' α -terpinéol, le *trans*-pinocarvéol, le bornéol ou encore le terpinen-4-ol. Sa composition est relativement similaire à celle de l'hydrolat produit à partir des aiguilles de l'épinette noire, à l'exception de l'acétate de bornyle.

À ce jour, les huiles essentielles distillées à partir d'écorces de conifères ne sont pas couramment produites, et très peu d'études scientifiques les ont investiguées. Les huiles essentielles de conifères disponibles dans le commerce sont majoritairement issues des feuillages (pins, sapins, épinettes), du bois (cèdres) ou de la résine (térébenthines). La production de cette nouvelle huile essentielle offre la possibilité d'utiliser les écorces comme matière première pour le développement de nouveaux produits aromatiques, notamment pour les domaines de la parfumerie et des arômes. Une utilisation en cosmétique et en tant qu'arôme/agent de conservation en agroalimentaire de l'huile essentielle d'écorce d'épinette

noire serait également envisageable dans la mesure où certaines bioactivités notamment antibactériennes et antioxydantes seraient validées.

Peu de différences ont été observées en comparant les compositions et les rendements des huiles essentielles et des hydrolats produits par entraînement à la vapeur et distillation à l'eau. Les compositions des produits sont similaires et les rendements équivalents. Une optimisation de l'hydrodistillation semble néanmoins nécessaire afin d'augmenter les rendements des huiles essentielles (0,05%). Bien qu'ils soient rarement très élevés (0,4 à 1,4%) pour les huiles essentielles d'aiguilles de conifères, ils pourraient être améliorés par une étude plus poussée de l'influence des paramètres d'hydrodistillation.

L'extraction simultanée des molécules hydrosolubles pendant l'hydrodistillation a permis de récupérer des extraits aqueux enrichis en polyphénols. L'étude des différents extraits produits a mis en évidence leur potentiel antioxydant et leurs teneurs élevées en polyphénols dont le *trans*-resvératrol, molécule connue pour ses multiples propriétés thérapeutiques. Des deux procédés d'hydrodistillation testés, la distillation à l'eau semble être la technique d'extraction la plus intéressante. En effet, l'extrait aqueux obtenu WD-DE possède le rendement le plus élevé (21,6%) et un taux de *trans*-resvératrol remarquable (627 mg/100 g d'extrait sec). L'étude préliminaire sur la composition en polyphénols de faible poids moléculaire de ces extraits a permis de confirmer la présence des mêmes molécules que lors d'une extraction à l'eau chaude simple (à l'exception de l'astringine) dans des proportions du même ordre de grandeur. Ainsi le procédé intégré peut être considéré comme étant viable pour la production simultanée d'extrait aqueux en comparaison avec une extraction à l'eau chaude classique.

L'extrait aqueux obtenu par extraction classique à l'eau chaude a également été investigué plus en détails dans ce projet, au vu de ces bioactivités rapportées dans la littérature. Cette recherche a permis d'élucider la composition de l'extrait aqueux brut d'écorce d'épinette noire, que ce soit de manière globale, avec la quantification relative des grandes familles chimiques et de manière plus spécifique avec l'isolation des polyphénols de faible poids moléculaire.

Dans ce projet, la priorité a été mise sur l'identification des composés phénoliques de faible poids moléculaire. La composition chimique s'est révélée riche en stilbènes, en accord avec la chimiotaxonomie du genre *Picea*. L'isorhapontine, un dérivé glycosylé et méthoxylé du

trans-resveratrol a été identifié comme composé majoritaire, avec des concentrations allant jusqu'à 12% de l'extrait sec. D'autres stilbènes tels que l'astringine, le resvératrol et l'isorhapontigénine ont été isolés, mais c'est la première fois que le *trans*-piceid, dérivé glycosylé du *trans*-resvératrol est identifié dans *Picea mariana*. Ces composés ont un potentiel pharmacologique démontré, avec notamment des activités antioxydantes, anticancérogènes et anti-inflammatoires. De plus, deux nouveaux stéréoisomères de stilbènes ont été découverts. Il s'agit de deux dimères d'isorhapontine, différant par la stéréochimie de leurs deux carbones asymétriques. Nommés picéaside O et picéaside P, ces nouvelles molécules viennent compléter la famille des oligomères de stilbène et enrichir les connaissances scientifiques sur les composés synthétisés par le genre *Picea*.

Dans le but d'être plus sélectif dans les composés extraits, une optimisation de l'extraction à l'eau chaude a permis d'évaluer l'influence des paramètres d'extraction sur les concentrations en différents composés chimiques. Les résultats ont mis en évidence deux paramètres à privilégier pour récupérer préférentiellement les polyphénols : une température de 80 °C et un ratio écorce/eau de 50 mg/mL. La complexité des résultats obtenus durant l'optimisation a également permis de tester une approche statistique intéressante de traitement des données par la chimiométrie et la méthode des empreintes chimiques. Ces techniques, plus souvent employées dans le contrôle qualité des plantes médicinales se sont révélées efficaces dans l'analyse d'une optimisation de procédé.

De plus, l'analyse de la composition des 36 extraits issus de l'optimisation de l'extraction a permis de mettre en évidence un profil caractéristique de composition de l'extrait à l'eau chaude de l'écorce d'épinette noire.

L'extrait aqueux contient beaucoup de sucres (la proportion relative pouvant atteindre 60% de l'extrait sec). Cependant il s'agit d'une estimation des sucres totaux, prenant en compte les sucres libres comme les sucres liés aux molécules. Riche en polyphénols, l'extrait aqueux en contient de 40 à 50 % en proportion relative, dont une moitié serait des tanins condensés (22 à 26 % de proportion relative en proanthocyanidines) et l'autre moitié serait les composés phénoliques de faibles poids moléculaires (15 à 32% de l'extrait sec). De plus, la présence systématique des huit molécules identifiées dans les 36 extraits, dans des ratios constants,

permet de mettre en évidence l'existence d'un motif caractéristique de composition chimique de l'extrait aqueux d'écorce de l'épinette noire.

7.2. Perspectives

Afin d'améliorer les performances du procédé intégré, une optimisation de l'hydrodistillation pourrait être envisagée, sur le même modèle que l'optimisation de l'extraction aqueuse. Plusieurs paramètres influençant la distillation à l'eau pourraient alors être testés et comparés via des analyses statistiques. Il serait ainsi possible d'évaluer la reproductibilité du procédé et la qualité des extraits obtenus, tout en essayant d'augmenter les rendements en huile essentielle. Suite à l'optimisation des paramètres d'hydrodistillation, une mise à l'échelle industrielle permettrait de valider la faisabilité et la rentabilité du procédé. Une étude plus poussée sur la composition de l'extrait aqueux obtenu pendant le procédé intégré et sa toxicité serait également intéressante.

La composition de l'extrait à l'eau chaude de l'épinette noire riche en stilbènes a révélé un potentiel pharmacologique certain. En effet, le *trans*-resvératrol, notamment, a été largement investigué pour ses multiples propriétés thérapeutiques. En revanche, ces composés dérivés comme l'isorhapontine par exemple, ont très peu été étudiés. Étant donné la proportion de cette molécule dans l'extrait aqueux d'écorce d'épinette noire, il serait intéressant de tester ses bioactivités. Les deux picéasides O et P nouvellement découverts seraient également à investiguer en tant que nouvelles molécules actives potentielles. D'autres pistes restent encore à explorer dans l'élucidation de la composition chimique, dont notamment celle de l'identification des tanins condensés. L'analyse plus spécifique des sucres libres permettrait également de compléter la caractérisation exhaustive de l'extrait à l'eau chaude, étant donné leur abondance. La faible proportion de composés azotés pourrait également être étudiée, notamment afin de déterminer s'il s'agit de protéines ou d'alcaloïdes.

Ce projet de doctorat ouvre des voies d'exploration pour la valorisation de la biomasse forestière, notamment vers le développement et la production d'autres extraits forestiers. En effet, de nouvelles huiles essentielles pourraient être distillées à partir des écorces résiduelles des essences de conifères du Canada, et devenir des nouveaux produits aromatiques pour les

arômes et parfums notamment. Enfin, le procédé intégré pourrait être adapté à chaque matière première et permettre une valorisation complète des résidus de transformation, tout en produisant tout une gamme d'extraits naturels à haute valeur ajoutée.

Bibliographie

- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate polymers*, 97(2), 253-261.
- Aliksir (2016). Retrieved from <https://aliksir.com/en/black-spruce-picea-mariana-hydrosol.html> (May 2017).
- Andersen, A., Gagnon, H., Collin, G., & Adams, R. P. (1995). Essential oil of the wood of *Thuja occidentalis* L. *Journal of Essential Oil Research*, 7(5), 489-495. doi: 10.1080/10412905.1995.9698572
- Aritomi, M., & Donnelly, D. M. (1976). Stilbene glucosides in the bark of *Picea sitchensis*. *Phytochemistry*, 15(12), 2006-2008.
- Arnason, T., Hebda, R. J., & Johns, T. (1981). Use of plants for food and medicine by Native Peoples of eastern Canada. *Canadian Journal of Botany*, 59(11), 2189-2325.
- Bağci, E., & Diğrak, M. (1996). Antimicrobial activity of essential oils of some *Abies* (Fir) species from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 11(4), 251-256.
- Bağci, E., Hayta, S., & Dogan, G. (2011). Chemical composition of essential oils from bark and leaves of *Pinus brutia* Ten. from Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 23(6), 2782.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042
- Banthorpe, D. V., Gatford, C., & Williams, S. R. (1973). Monoterpene patterns in *Juniperus* and *Thuja* species. *Planta Medica*, 23(01), 64-69.
- Barrero, A. F., Herrador, M., Arteaga, P., Arteaga, J. F., & Arteaga, A. F. (2012). Communic acids: occurrence, properties and use as chirons for the synthesis of bioactive compounds. *Molecules*, 17(2), 1448-1467.
- Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (2009). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*: CRC Press.
- Başer, K. H. C., & Demircakmak, B. (1995). The essential oil of taurus cedar (*Cedrus libani* A. rich): Recent results. *Chemistry of Natural Compounds*, 31(1), 16-20.
- Benaim, C. (1984). Fragrances & Moods: New perspectives. *Perfumer & flavorist*, 9, 13-16.
- Bérubé-Gagnon, J. (2006). *Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de Picea mariana*. Université du Québec à Chicoutimi (Thèse).

- Borg-Karlson, A. K., Lindström, M., Norin, T., Persson, M., & Valterová, I. (1993). Enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in different tissues of Norway spruce, *Picea abies* (L) Karst. A multi-dimensional gas chromatography study. *Acta Chemica Scandinavia*, 47, 138-144.
- Boulila, A., Hassen, I., Haouari, L., Mejri, F., Amor, I. B., Casabianca, H., & Hosni, K. (2015). Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). *Industrial Crops and Products*, 74, 485-493. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.050
- Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R., & Bessiere, J. M. (2003). Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(6), 481-484. doi: 10.1002/ffj.1226
- Browne, T., Jemaa, N., Karidio, I., Mahmood, T., Paice, M., Paleologou, M., . . . Zhang, X. (2013). Forest biorefinery: current state of the art. In P. R. Stuart & M. M. El-Halwagi (Eds.), *Integrated Biorefineries: Design, Analysis, and Optimization* (pp. 491-516): CRC Press, Boca Raton.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales* (3e éd. rev. et augm ed.). Paris: Tec&Doc.
- Bulk Supplements. (2016). Retrieved online from <http://www.bulksupplements.com/resveratrol-pure.html> (May 2017).
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Canillac, N., & Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 18(3), 261-268.
- Carnachan, S. M., & Harris, P. J. (2000). Ferulic acid is bound to the primary cell walls of all gymnosperm families. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(9), 865-879.
- Cassidy, A., Hanley, B., & Lamuela-Raventos, R. M. (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes—origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1044-1062.
- Chaftar, N., Girardot, M., Labanowski, J., Ghrairi, T., Hani, K., Frere, J., & Imbert, C. (2016). Comparative evaluation of the antimicrobial activity of 19 essential oils. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 901, 1-15. doi: 10.1007/5584_2015_5011
- Chalchat, J.-C., Garry, R.-P., Miehet, A., & Benjlali, B. (1994). Essential oil components in sawdust of *Cedrus atlantica* from Morocco. *Journal of Essential Oil Research*, 6(3), 323-325. doi: 10.1080/10412905.1994.9698386

- Chaouche, T. M., Haddouchi, F., Ksouri, R., Medini, F., & Atik-Bekara, F. (2013). *In vitro* evaluation of antioxidant activity of the hydro-methanolic extracts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Phytothérapie*, *11*(4), 244-249. doi: 10.1007/s10298-013-0779-5
- Chaudhary, A., Kaur, P., Singh, B., & Pathania, V. (2009). Chemical composition of hydrodistilled and solvent volatiles extracted from woodchips of Himalayan *Cedrus: Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. *Natural Product Communications*, *4*(9), 1257-1260.
- Chémat, F. (2012). Extraction des huiles essentielles à travers l'histoire. In X. Fernandez & F. Chémat (Eds.), *La chimie des huiles essentielles: tradition et innovation* (Vuibert ed., pp. 59-75).
- Chémat, F., Fabiano-Tixier, A.-S., & Vian, M. A. (2012a). Eco-extraction des huiles essentielles : intensification et innovation. In X. Fernandez & F. Chémat (Eds.), *La chimie des huiles essentielles: tradition et innovation* (Vuibert ed., pp. 102-123).
- Chémat, F., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., Allaf, T., & Vorobiev, E. (2015). Solvent-free extraction of food and natural products. *Trends in Analytical Chemistry*, *71*, 157-168.
- Chémat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012b). Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(7), 8615-8627.
- Chen, W., Liu, Y., Li, M., Mao, J., Zhang, L., Huang, R., Ye, L. (2015a). Anti-tumor effect of alpha-pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. *Journal of Pharmacological Sciences*, *127*(3), 332-338. doi: 10.1016/j.jphs.2015.01.008
- Chen, Y., Zhang, D.-Q., Liao, Z., Wang, B., Gong, S., Wang, C., . . . Liao, F.-F. (2015b). Anti-oxidant polydatin (piceid) protects against substantia nigral motor degeneration in multiple rodent models of Parkinson's disease. *Molecular neurodegeneration*, *10*(1), 4.
- Cheng, X., Deng, J., Zhang, S., Riedl, B., & Cloutier, A. (2006). Impact of bark content on the properties of medium density fiberboard (MDF) in four species grown in eastern Canada. *Forest products journal*, *56*(3), 64.
- Cho, S.-M., Lee, E.-O., Kim, S.-H., & Lee, H.-J. (2014). Essential oil of *Pinus koraiensis* inhibits cell proliferation and migration via inhibition of p21-activated kinase 1 pathway in HCT116 colorectal cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, *14*(1), 275.
- Chow, P. S., & Landhäusser, S. M. (2004). A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree physiology*, *24*(10), 1129-1136.

- Clinical Trial (2012). A single dose study of EPN-07 by oral gavage in rats with a 14 Day recovery period (up and down procedure), Confidential: Charles River Laboratories, Edinburgh, UK.
- Commodari, F., Khiat, A., Ibrahimi, S., Brizius, A. R., & Kalkstein, N. (2005). Comparison of the phytoestrogen *trans*-resveratrol (3, 4', 5-trihydroxystilbene) structures from x-wafforay diffraction and solution NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *43*(7), 567-572.
- Conner, A., Diehl, M., & Rowe, J. (1980). Tall oil precursors and turpentine in jack and eastern white pine. *Wood Science*, *12*(4), 194-200.
- Counet, C., Callemien, D., & Collin, S. (2006). Chocolate and cocoa: new sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid. *Food Chemistry*, *98*(4), 649-657.
- Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (2008). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*: John Wiley & Sons.
- D'Andrea, G. (2010). Pycnogenol: a blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, *81*(7), 724-736.
- Dayawansa, S., Umeno, K., Takakura, H., Hori, E., Tabuchi, E., Nagashima, Y., Oosu, H., Yada, Y., Suzuki, T. & Ono, T. (2003). Autonomic responses during inhalation of natural fragrance of "Cedrol" in humans. *Autonomic Neuroscience*, *108*(1), 79-86.
- De Pinho, P. G., Goncalves, R. F., Valentao, P., Pereira, D. M., Seabra, R. M., Andrade, P. B., & Sottomayor, M. (2009). Volatile composition of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *49*(3), 674-685. doi: 10.1016/j.jpba.2008.12.032
- Demirbas, A. (2002). Relationships between heating value and lignin, moisture, ash and extractive contents of biomass fuels. *Energy Exploration & Exploitation*, *20*(1), 105-111. doi: 10.1260/014459802760170420
- Desrochers, L. (2011). Récolte et ségrégation de la biomasse ligneuse en forêt (Harvest and segregation of lineous biomass in forest).
- Diouf, P. N., Stevanovic, T., & Cloutier, A. (2009). Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chemistry*, *113*(4), 897-902. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.08.016.
- Diouf, P. N., Tibirna, C. M., García-Pérez, M.-E., Royer, M., Dubé, P., & Stevanovic, T. (2013). Structural elucidation of condensed tannin from *Picea mariana* bark. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, *4*(03), 1.

- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- Du, Q.-H., Peng, C., & Zhang, H. (2013). Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics. *Pharmaceutical biology*, 51(11), 1347-1354.
- EBioChem (2017). Retrieved online from <http://www.ebiochem.com/product/pine-bark-extract-71323>. (May 2017).
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124(2), 411-421.
- Elzaawely, A. A., Xuan, T. D., & Tawata, S. (2007). Essential oils, kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizomes of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 103(2), 486-494. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.08.025.
- Ennajar, M., Bouajila, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Abderraba, M., Raies, A., & Romdhane, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae). *Journal of Food Science*, 74(7), 364-371. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01277.x.
- Fang, Y. N., & Liu, G. T. (2002). Effect of isorhapontigenin on respiratory burst of rat neutrophils. *Phytomedicine*, 9(8), 734-738.
- Feijó, E. V. R. d. S., de Oliveira, R. A., & Costa, L. C. d. B. (2014). Light affects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(5), 516-523. doi: 10.1016/j.bjp.2014.10.005.
- Feng, S., Cheng, S., Yuan, Z., Leitch, M., & Xu, C. (2013). Valorization of bark for chemicals and materials: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 26, 560-578. doi: 10.1016/j.rser.2013.06.024.
- Fernández-Agulló, A., Freire, M. S., & González-Álvarez, J. (2015). Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. *Industrial Crops and Products*, 64, 105-113.
- Fernandez, X., & Chémat, F. (2012). *La chimie des huiles essentielles : tradition et innovation*. Paris: Vuibert.
- Fleisher, A. (1991). Water-soluble fractions of the essential oils. *Perfumer and Flavorist*, 16(3), 37-41.

- Fragrantica (2017). Retrieved online from <https://www.fragrantica.com> (perfumery database).
- Francezon, N., & Stevanovic, T. (2017a). Chemical composition of essential oil and hydrosol from *Picea mariana* bark residue. *BioResources*, *12*(2), 2635-2645.
- Francezon, N., & Stevanovic, T. (2017b). Integrated process for the production of natural extracts from black spruce bark. *Industrial Crops and Products*, *108*, 348-354.
- Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life sciences*, *66*(8), 663-673.
- Gabaston, J., Richard, T., Biais, B., Waffo-Téguo, P., Pedrot, E., Jourdes, M., Corio-Costet, M.-F., Mérillon, J.-M. (2017). Stilbenes from common spruce (*Picea abies*) bark as natural antifungal agent against downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Industrial Crops and Products*, *103*, 267-273. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.04.009.
- Gagnon, R., Morin, H. (2001). Les forêts d'épinette noire du Québec - Dynamique, perturbations et diversité. *Le Naturaliste Canadien*, *125*(3).
- Garcia-Perez, M. E., Royer, M., Duque-Fernandez, A., Diouf, P. N., Stevanovic, T., & Pouliot, R. (2010). Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, *132*(1), 251-258. doi: 10.1016/j.jep.2010.08.030.
- Garcia-Perez, M. E., Royer, M., Herbette, G., Desjardins, Y., Pouliot, R., & Stevanovic, T. (2012). *Picea mariana* bark: a new source of *trans*-resveratrol and other bioactive polyphenols. *Food Chemistry*, *135*(3), 1173-1182. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.050.
- Garneau, F.-X., Collin, G., Gagnon, H., & Pichette, A. (2012). Chemical composition of the hydrosol and the essential oil of three different species of the Pinaceae family : *Picea glauca* (Moench) Voss., *Picea mariana* (Mill.) B.S.P., and *Abies balsamea* (L.) Mill. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *15*(2), 227-236. doi: 10.1080/0972060x.2012.10644040.
- Geoffroy, T. R., Fortin, Y., & Stevanovic, T. (2017). Hot-water extraction optimization of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) and red maple (*Acer rubrum* L.) bark applying principal component analysis. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 1-12.
- Giannoccaro, E., Wang, Y. J., & Chen, P. (2006). Effects of solvent, temperature, time, solvent-to-sample ratio, sample size, and defatting on the extraction of soluble sugars in soybean. *Journal of Food Science*, *71*(1).
- Goldblatt, L. (1952). American turpentine. In E. Guenther (Ed.), *The essential oils* (Vol. 6, pp. 253-308).

- Gromova, A. S., Lutskii, V. I., & Tyukavkina, N. A. (1974). Phenolic acids and their glycosides from the phloem of *Picea jezoensis* and *P. koraiensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 10(6), 825-825.
- Guenther, E. (1952). *The essential oils* (Vol. 6). New York, USA: D. Van Nostrand Company, Inc.
- Guerrini, A., Rossi, D., Grandini, A., Scalvenzi, L., Rivera, P. F. N., Andreotti, E., . . . Maietti, S. (2014). Biological and chemo-diverse characterization of Amazonian (Ecuador) Citrus petitgrains. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87. doi: 10.5073/jabfq.2014.087.017.
- Gülçin, İ., Büyükokuroğlu, M. E., Oktay, M., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003). Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(1), 51-58. doi: 10.1016/s0378-8741(03)00036-9
- Harkin, J. M., & Rowe, J. W. (1971). Bark and its possible uses. *Forest Product Laboratory, Forest Service, USDA (Research Note 091)*, 56 p.
- Hartonen, K., & Riekkola, M.-L. (2017). Water as the first choice green solvent. In M. Tobiszewski & F. Pena-Pereira (Eds.), *The Application of Green Solvents in Separation Processes* (pp. 19-55): Elsevier.
- Hassan, S. B., Gali-Muhtasib, H., Göransson, H., & Larsson, R. (2010). Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-κB signalling. *Anticancer Research*, 30(6), 1911-1919.
- Hedenström, E., Edfeldt, A. F., Edman, M., & Jonsson, B.-G. (2016). Resveratrol, piceatannol, and isorhapontigenin from Norway spruce (*Picea abies*) debarking wastewater as inhibitors on the growth of nine species of wood-decaying fungi. *Wood Science and Technology*, 50(3), 617-629.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Dermont, C., Joseph, H., & Bailleul, F. (2006). The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. *Chemistry & biodiversity*, 3(10), 1116-1125. doi: 10.1002/cbdv.200690113
- Hiscock, V. W. (1956). Some extractives from black spruce (*Picea Mariana*) bark (Doctoral dissertation, Memorial University of Newfoundland).
- Höld, K. M., Sirisoma, N. S., Ikeda, T., Narahashi, T., & Casida, J. E. (2000). α -Thujone (the active component of absinthe): γ -aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(8), 3826-3831.

- Hong, E.-J., Na, K.-J., Choi, I.-G., Choi, K.-C., & Jeung, E.-B. (2004). Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(6), 863-866.
- Hooper, S. N., & Chandler, R. F. (1984). Herbal remedies of the Maritime Indians: phytosterols and triterpenes of 67 plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 10(2), 181-194.
- Huang, K.-S., Wang, Y.-H., Li, R.-L., & Lin, M. (2000). Five new stilbene dimers from the lianas of *Gnetum hainanense*. *Journal of Natural Products*, 63(1), 86-89.
- Hudson, J., Kuo, M., & Vimalanathan, S. (2011). The antimicrobial properties of cedar leaf (*Thuja plicata*) oil; a safe and efficient decontamination agent for buildings. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(12), 4477-4487.
- Jeandet, P., Delaunois, B., Conreux, A., Donnez, D., Nuzzo, V., Cordelier, S., Clément, C. & Courot, E. (2010). Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *Biofactors*, 36(5), 331-341.
- Jeong, S. I., Lim, J. P., & Jeon, H. (2007). Chemical composition and antibacterial activities of the essential oil from *Abies koreana*. *Phytotherapy Research*, 21(12), 1246-1250. doi: 10.1002/ptr.2229.
- Jo, J. R., Park, J. S., Park, Y. K., Chae, Y. Z., Lee, G. H., Park, G. Y., & Jang, B. C. (2012). *Pinus densiflora* leaf essential oil induces apoptosis via ROS generation and activation of caspases in YD-8 human oral cancer cells. *International Journal of Oncology*, 40(4), 1238-1245. doi: 10.3892/ijo.2011.1263.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962.
- Kamdem, P. D., Hanover, J. W., & Gage, D. A. (1993). Contribution to the study of the essential oil of *Thuja occidentalis* L. *Journal of Essential Oil Research*, 5(2), 117-122.
- Kartnig, T., Still, F., & Reinthaler, F. (1991). Antimicrobial activity of the essential oil of young pine shoots (*Picea abies* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 35(2), 155-157.
- Kasangana, P. B., Haddad, P. S., & Stevanovic, T. (2015). Study of polyphenol content and antioxidant capacity of *Myrianthus arboreus* (Cecropiaceae) root bark extracts. *Antioxidants*, 4(2), 410-426.
- Keeling, C. I., & Bohlmann, J. (2006). Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist*, 170(4), 657-675. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01716.x.

- Kemppainen, K., Siika-Aho, M., Pattathil, S., Giovando, S., & Kruus, K. (2014). Spruce bark as an industrial source of condensed tannins and non-cellulosic sugars. *Industrial Crops and Products*, 52, 158-168.
- Khan, S., Krigstin, S., Volpé, S., & Wetzal, S. (2014). Essential oil composition of forest biomass stored under industrial conditions in Eastern Canada. *Industrial Crops and Products*, 56, 35-42. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.02.026.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.
- Kim, J. H., Lee, H. J., Jeong, S. J., Lee, M. H., & Kim, S. H. (2012). Essential oil of *Pinus koraiensis* leaves exerts antihyperlipidemic effects via up-regulation of low-density lipoprotein receptor and inhibition of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Phytotherapy Research*, 26(9), 1314-1319. doi: 10.1002/ptr.3734.
- Kızılarıslan, Ç., & Sevg, E. (2013). Ethnobotanical uses of genus *Pinus* L. (Pinaceae) in Turkey. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 12(2), 209-220.
- Kononenko, I., de Viguierie, L., Rochut, S., & Walter, P. (2016). Qualitative and quantitative studies of chemical composition of sandarac resin by GC-MS. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-6.
- Kotan, R., Kordali, S., & Cakir, A. (2007). Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(7-8), 507-513.
- Krokene, P., Nagy, N. E., & Krekling, T. (2008). Traumatic resin ducts and polyphenolic parenchyma cells in conifers. In Schaller, A. (Ed) *Induced plant resistance to herbivory* (pp. 147-169): Springer.
- Kubeczka, K. H., & Schultze, W. (1987). Biology and chemistry of conifer oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 2(4), 137-148.
- Kulkarni, A., Suzuki, S., & Etoh, H. (2008). Antioxidant compounds from *Eucalyptus grandis* biomass by subcritical liquid water extraction. *Journal of wood science*, 54(2), 153-157.
- Latva-Mäenpää, H., Laakso, T., Sarjala, T., Wähälä, K., & Saranpää, P. (2013). Variation of stilbene glucosides in bark extracts obtained from roots and stumps of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Trees*, 27(1), 131-139.
- Lee, J.-H., Lee, K., Lee, D. H., Shin, S. Y., Yong, Y., & Lee, Y. H. (2015). Anti-invasive effect of β -myrcene, a component of the essential oil from *Pinus koraiensis* cones, in metastatic MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 58(4), 563-569. doi: 10.1007/s13765-015-0081-3.

- Lee, S., Lee, H., Min, H., Park, E., Lee, K., Ahn, Y., . . . Pyee, J. (2005). Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. *Fitoterapia*, *76*(2), 258-260.
- Leffingwell, J. C., & Alford, E. (2011). Volatile constituents of the giant puffball mushroom (*Calvatia gigantea*). *Leffingwell Reports*, *4*, 1-17.
- Legault, J., Dahl, W., Debiton, E., Pichette, A., & Madelmont, J.-C. (2003). Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. *Planta Medica*, *69*(05), 402-407.
- Legendre, L. (2012). Voies de biosynthèse des huiles essentielles. In X. Fernandez & F. Chemat (Eds.), *La chimie des huiles essentielles: tradition et innovation* (Vuibert ed., pp. 92-101).
- Li, H.-L., Wang, A.-B., Huang, Y., Liu, D.-P., Wei, C., Williams, G. M., . . . Hao, D.-L. (2005). Isorhapontigenin, a new resveratrol analog, attenuates cardiac hypertrophy via blocking signaling transduction pathways. *Free Radical Biology and Medicine*, *38*(2), 243-257.
- Li, L., Henry, G. E., & Seeram, N. P. (2009). Identification and bioactivities of resveratrol oligomers and flavonoids from *Carex folliculata* seeds. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, *57*(16), 7282-7287. doi: 10.1021/jf901716j.
- Li, S. H., Niu, X. M., Zahn, S., Gershenzon, J., Weston, J., & Schneider, B. (2008). Diastereomeric stilbene glucoside dimers from the bark of Norway spruce (*Picea abies*). *Phytochemistry*, *69*(3), 772-782. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.08.033.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.-S., & Chémat, F. (2014). Essential Oils: From conventional to green extraction. In Springer (Ed.), *Essential oils as reagents in green chemistry* (pp. 9-20).
- Liang, Y., Zhu, J., Huang, H., Xiang, D., Li, Y., Zhang, D., . . . Jiang, G. (2016). SESN2/sestrin 2 induction-mediated autophagy and inhibitory effect of isorhapontigenin (ISO) on human bladder cancers. *Autophagy*, *12*(8), 1229-1239.
- Lis-Balchin, M., & Deans, S. (1997). Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of applied microbiology*, *82*(6), 759-762.
- Loizzo, M. R., Saab, A., Tundis, R., Statti, G. A., Lampronti, I., Menichini, F., . . . Doerr, H. W. (2008). Phytochemical analysis and in vitro evaluation of the biological activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) of *Cedrus libani* A. Rich. *Phytomedicine*, *15*(1-2), 79-83. doi: 10.1016/j.phymed.2007.03.013.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., & Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(13), 2046-2056.

- Manach, C., Mazur, A., & Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16(1), 77-84.
- Manners, G. D., & Swan, E. P. (1971). Stilbenes in the barks of five Canadian *Picea* species. *Phytochemistry*, 10, 607-610.
- Mannila, E., & Talvitie, A. (1992). Stilbenes from *Picea abies* bark. *Phytochemistry*, 31(9), 3288-3289.
- Maruzzella, J. C., & Sicurella, N. A. (1960). Antibacterial activity of essential oil vapors. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(11), 692-694.
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833-839. doi: 10.1016/j.jclepro.2004.02.039.
- Matsubara, E., Fukagawa, M., Okamoto, T., Ohnuki, K., Shimizu, K., & Kondo, R. (2011). The essential oil of *Abies sibirica* (Pinaceae) reduces arousal levels after visual display terminal work. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(3), 204-210. doi: 10.1002/ffj.2056.
- McCune, L. M. (2012). Traditional medicinal plants of indigenous peoples of Canada and their antioxidant activity in relation to treatment of diabetes. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes: Bioactive Foods in Chronic Disease States*, 221.
- Meda, N., Rott, M., Suwal, S., Poubelle, P., & Stevanovic, T. (2017). Chemometrics-based approach to analysis of phenolic fingerprints of red and sugar maple bud extracts. *Austin Biochemistry*, 2(1), 1009.
- Mega Resveratrol (2013). Retrieved online from <https://megaresveratrol.net/product/wholesale-trans-resveratrol-powder/> (May 2017).
- Mercier, B., Prost, J., & Prost, M. (2009). The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): a review. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 22(4), 331-342. doi:10.2478/v10001-009-0032-5.
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
- Mills, J. S., & White, R. (1977). Natural resins of art and archaeology their sources, chemistry, and identification. *Studies in Conservation*, 22(1), 12-31.
- Mirov, N. T. (1946). *Pinus*: a contribution of turpentine chemistry to dendrology and forest genetics. *Journal of Forestry*, 44(1), 13-16.

- Mirov, N. T. (1948). The terpenes (in relation to the biology of genus *Pinus*). *Annual Review of Biochemistry*, 17(1), 521-540.
- Monin, C. (2012). Les techniques de distillation des plantes. In X. Fernandez & F. Chemat (Eds.), *La chimie des huiles essentielles : tradition et innovation* (Vuibert ed., pp. 78-101).
- Morris, J., Khettry, A., & Seitz, E. (1979). Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(5), 595-603.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., . . . Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171. doi: 10.1016/S0308-8146(00)00223-5.
- Mühlbauer, R. C., Lozano, A., Palacio, S., Reinli, A., & Felix, R. (2003). Common herbs, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism. *Bone*, 32(4), 372-380. doi: 10.1016/s8756-3282(03)00027-9
- Mulat, D. G., Latva-Mäenpää, H., Koskela, H., Saranpää, P., & Wähälä, K. (2014). Rapid Chemical Characterisation of Stilbenes in the Root Bark of Norway Spruce by Off-line HPLC/DAD–NMR. *Phytochemical Analysis*, 25(6), 529-536.
- Navarrete, A., Herrero, M., Martín, A., Cocero, M. J., & Ibáñez, E. (2011). Valorization of solid wastes from essential oil industry. *Journal of Food Engineering*, 104(2), 196-201. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.10.033.
- New Directions Aromatics Inc (2017). Retrieved online from <https://www.newdirectionsaromatics.ca/products/essential-oils/spruce-essential-oil-black-wild.html> (May 2017).
- Nurzyńska-Wierdak, R. (2014). Biological active compounds from roots of *Valeriana officinalis* L. cultivated in south-eastern region of Poland. *Farmacia*, 62(4), 683-692.
- Oh, H.-J., Ahn, H.-M., So, K.-H., Kim, S.-S., Yun, P.-Y., Jeon, G.-L., & Riu, K.-Z. (2007). Chemical and antimicrobial properties of essential oils from three coniferous trees *Abies koreana*, *Cryptomeria japonica*, and *Torreya nucifera*. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 50(3), 164-169.
- Orav, A., Kuningas, K., & Kailas, T. (1995). Computerized capillary gas chromatographic identification and determination of Siberian fir oil constituents. *Journal of Chromatography A*, 697(1-2), 495-499.
- Owen, S. M., & Penuelas, J. (2005). Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. *Trends in Plant Science*, 10(9), 420-426. doi: 10.1016/j.tplants.2005.07.010.
- Palma, M., Barbero, G. F., Pineiro, Z., Barroso, C. G., Rostagno, M. A., Prado, J. M., & Meireles, M. A. A. (2013). Extraction of natural product : principles and fundamental

- aspects. In M. A. Rostagno & J. M. Prado (Eds.), *Natural product extraction: principles and applications* (pp. 58-88): Royal Society of Chemistry.
- Pan, H., & Lundgren, L. N. (1995). Phenolic extractives from root bark of *Picea abies*. *Phytochemistry*, 39(6), 1423-1428.
- Pauli, A., & Schilcher, H. (2010). In vitro antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia 6th edition. In K. H. C. Başer & G. Buchbauer (Eds.), *Handbook of essential oils : science, technology, and applications* (pp. 353-540). Boca Raton: Taylor & Francis.
- Pelkonen, O., Abass, K., & Wiesner, J. (2013). Thujone and thujone-containing herbal medicinal and botanical products: Toxicological assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65(1), 100-107.
- Peschel, W., Sánchez-Rabameda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., Lamuela-Raventós, R., Buxaderas, S., Codina, C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97(1), 137-150. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.03.033.
- Pichette, A., Garneau, F.-X., Jean, F.-I., Riedl, B., & Girard, M. (1998). Chemical differences between the wood extracts of Jack pine (*Pinus Banksiana*), black spruce (*Picea Mariana*) and balsam fir (*Abies Balsamea*) from eastern Canada. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 18(4), 427-438. doi: 10.1080/02773819809349590.
- Pichette, A., Larouche, P. L., Lebrun, M., & Legault, J. (2006). Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytotherapy Research*, 20(5), 371-373. doi: 10.1002/ptr.1863.
- Pigman, W., Anderson, E., Fischer, R., Buchanan, M. A., & Browning, B. L. (1953). Colors precursors in spruce woods and western hemlockwoods and inner barks. *Tappi*, 36(1), 4-12.
- Piotrowska, H., Kucinska, M., & Murias, M. (2012). Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 750(1), 60-82.
- Plumed-Ferrer, C., Väkeväinen, K., Komulainen, H., Rautiainen, M., Smeds, A., Raitanen, J.-E., Eklund, P., Willfor, S., Alakomi, H.-L., Saarela, M. (2013). The antimicrobial effects of wood-associated polyphenols on food pathogens and spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 99-107.
- Poaty, B., Lahlah, J., Porqueres, F., & Bouafif, H. (2015). Composition, antimicrobial and antioxidant activities of seven essential oils from the North American boreal forest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(6), 907-919. doi: 10.1007/s11274-015-1845-y.

- Porter, L. J., Hrstich, L. N., & Chan, B. G. (1985). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25(1), 223-230.
- Price, L., & Price, S. (2004). *Understanding hydrolats : the specific hydrosols for aromatherapy : a guide for health professionals*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Rao, B. R., Kaul, P., Syamasundar, K., & Ramesh, S. (2002). Water soluble fractions of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) essential oil. *Bioresource Technology*, 84(3), 243-246. doi: 10.1016/S0960-8524(02)00057-3.
- Registre Forestier (2017). Données extraites et estimations pour la production d'écorces SPME au Québec 2008-2016. Direction du développement de l'industrie des produits du bois, Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, Québec, Qc, Canada.
- Ritch-Krc, E., Turner, N., & Towers, G. (1996). Carrier herbal medicine: an evaluation of the antimicrobial and anticancer activity in some frequently used remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(3), 151-156.
- Rivière, C., Pawlus, A. D., & Mérillon, J.-M. (2012). Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports*, 29(11), 1317-1333.
- Robinson, A. L., Boss, P. K., Heymann, H., Solomon, P. S., & Trengove, R. D. (2011). Development of a sensitive non-targeted method for characterizing the wine volatile profile using headspace solid-phase microextraction comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(3), 504-517. doi: 10.1016/j.chroma.2010.11.008.
- Rohdewald, P. J. (2010). Pycnogenol French maritime pine bark extract. In J. M. B. Paul M Coates, Marc R Blackman, Gordon M Cragg, Mark Levine, Joel Moss, and Jeffrey D White (Ed.), *Encyclopedia of Dietary Supplements*. (Second ed., pp. 545-553).
- Ross, J., Gagnon, H., Girard, D., & Hachey, J.-M. (1996). Chemical composition of the bark oil of balsam fir *Abies balsamea* (L.) Mill. *Journal of Essential Oil Research*, 8(4), 343-346. doi: 10.1080/10412905.1996.9700636.
- Rossi, D., Guerrini, A., Maietti, S., Bruni, R., Paganetto, G., Poli, F., Scalvenzi, L., Radice, M., Saro, K. & Sacchetti, G. (2011). Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? *Food Chemistry*, 126(3), 837-848. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.042.
- Roupe, K. A., Remsberg, C. M., Yáñez, J. A., & Davies, N. M. (2006). Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. *Current Clinical Pharmacology*, 1(1), 81-101.

- Rowe, J., Bower, C. L., & Wagner, E. (1969). Extractives of jack pine bark: Occurrence of *cis*- and *trans*-pinosylvin dimethyl ether and ferulic acid esters. *Phytochemistry*, 8(1), 235-241.
- Roy, D., Konar, S. K., & Purdy, J. R. (1984). Sublimation of occidentalol, a sesquiterpene alcohol, from eastern white cedar (*Thuja occidentalis*) in a drying kiln. *Canadian Journal of Forest Research*, 14(3), 401-403.
- Royer, M., Prado, M., García-Pérez, M. E., Diouf, P. N., & Stevanovic, T. (2013). Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from Canadian forest species. *PharmaNutrition*, 1(4), 158-167. doi: 10.1016/j.phanu.2013.05.001.
- Rusanov, K., Garo, E., Rusanova, M., Fertig, O., Hamburger, M., Atanassov, I., & Butterweck, V. (2014). Recovery of polyphenols from rose oil distillation wastewater using adsorption resins--a pilot study. *Planta Medica*, 80(17), 1657-1664. doi: 10.1055/s-0034-1383145.
- Russo, M. V., & Avino, P. (2012). Characterization and identification of natural terpenic resins employed in "Madonna con Bambino e Angeli" by Antonello da Messina using gas chromatography–mass spectrometry. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 1-10.
- Saab, A. M., Guerrini, A., Sacchetti, G., Maietti, S., Zeino, M., Arend, J., Gambari, R., Bernardi, F., Efferth, T. (2012). Phytochemical analysis and cytotoxicity towards multidrug-resistant leukemia cells of essential oils derived from Lebanese medicinal plants. *Planta Medica*, 78(18), 1927-1931.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91(4), 621-632. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.06.031.
- Sato, M., Seki, K., Kita, K., Moriguchi, Y., Hashimoto, M., Yunoki, K., & Ohnishi, M. (2009). Comparative analysis of diterpene composition in the bark of the hybrid larch F1, *Larix gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi* and their parent trees. *Journal of Wood Science*, 55(1), 32-40.
- Satou, T., Matsuura, M., Takahashi, M., Umezu, T., Hayashi, S., Sadamoto, K., & Koike, K. (2011). Anxiolytic-like effect of essential oil extracted from *Abies sachalinensis*. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(6), 416-420. doi: 10.1002/ffj.2075.
- Schmidt, E. (2015). Production of essential oils. In K. H. C. Baser & G. Buchbauer (Eds.), *Handbook of essential oils: science, technology, and applications* (pp. 99-117): CRC Press, Boca Raton.
- Schneider, M. J., Montau, J. A., D., Z., & Stanton, C. E. (1991). Alkaloids of *Picea*. *Journal of Natural Products*, 54(3), 905-909.

- Selim, S. A., Adam, M. E., Hassan, S. M., & Albalawi, A. R. (2014). Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *BMC complementary and alternative medicine*, *14*(1), 179.
- Sell, C. (2010). Chemistry of essential oils. In K. H. C. Baser & G. Buchbauer (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Senelwa, K., & Sims, R. E. H. (1999). Fuel characteristics of short rotation forest biomass. *Biomass and Bioenergy*, *17*(2), 127-140. doi: 10.1016/S0961-9534(99)00035-5.
- Setzer, W. N., Setzer, M. C., Moriarity, D. M., Bates, R. B., & Haber, W. A. (1999). Biological activity of the essential oil of *Myrcianthes* sp. nov. "black fruit" from Monteverde, Costa Rica. *Planta Medica*, *65*(05), 468-469.
- Shaw, A. C. (1950). The essential oil of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Canadian Journal of Research*, *28*(Sec. B.), 268-276.
- Shen, T., Wang, X.-N., & Lou, H.-X. (2009). Natural stilbenes: an overview. *Natural Product Reports*, *26*(7), 916-935.
- Shinde, U., Phadke, A., Nair, A., Mungantiwar, A., Dikshit, V., & Saraf, M. (1999). Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. wood oil. *Journal of Ethnopharmacology*, *65*(1), 21-27.
- Singh, G., Maurya, S., DeLampasona, M. P., & Catalan, C. A. (2007). A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*, *45*(9), 1650-1661. doi: 10.1016/j.fct.2007.02.031.
- Slimestad, R. (2003). Flavonoids in buds and young needles of *Picea*, *Pinus* and *Abies*. *Biochemical Systematics and Ecology*, *31*(11), 1247-1255. doi: 10.1016/s0305-1978(03)00018-8.
- Smith, H. H. (1933). *Ethnobotany of the forest Potawatomi Indians* (Vol. 7): Order of the Board of Trustees.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (2001). The world of resveratrol *Nutrition and Cancer Prevention* (pp. 159-182): Springer US.
- Solhaug, K. A. (1990). Stilbene glucosides in bark and needles from *Picea* species. *Scandinavian Journal of Forest Research*, *5*(1-4), 59-67.
- Song, Z., Chen, W., Du, X., Zhang, H., Lin, L., & Xu, H. (2011). Chemical constituents of *Picea neoveitchii*. *Phytochemistry*, *72*(6), 490-494.

- St-Pierre, F., Achim, A., & Stevanovic, T. (2013). Composition of ethanolic extracts of wood and bark from *Acer saccharum* and *Betula alleghaniensis* trees of different vigor classes. *Industrial Crops and Products*, *41*, 179-187. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.04.027.
- Stevanovic, T., Diouf, P. N., & Garcia-Perez, M. E., (2009). Bioactive polyphenols from healthy diets and forest biomass. *Current Nutrition & Food Science*, *5*, 264-295.
- Stevanovic, T., & Perrin, D. (2009). *Chimie du bois*. Lausanne (Suisse): Presses polytechniques et universitaires romandes.
- Strack, D., Heilemann, J., Wray, V., & Dirks, H. (1989). Structures and accumulation patterns of soluble and insoluble phenolics from Norway spruce needles. *Phytochemistry*, *28*(8), 2071-2078.
- Struijs, K., Vincken, J.-P., Verhoef, R., van Oostveen-van Casteren, W. H., Voragen, A. G., & Gruppen, H. (2007). The flavonoid herbacetin diglucoside as a constituent of the lignan macromolecule from flaxseed hulls. *Phytochemistry*, *68*(8), 1227-1235.
- Surburg, H., & Panten, J. (2006). Natural raw materials in the flavor and fragrance industry *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses, 5th completely revised and enlarged edition* (pp. 177-238): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG.
- Telmo, C., & Lousada, J. (2011). The explained variation by lignin and extractive contents on higher heating value of wood. *Biomass and Bioenergy*, *35*(5), 1663-1667. doi: 10.1016/j.biombioe.2010.12.038.
- Tena, M., Rios, A., & Valcarcel, M. (1998). Supercritical fluid extraction of *t*-resveratrol and other phenolics from a spiked solid. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, *361*(2), 143-148.
- Teranishi, R., Buttery, R. G., & Sugisawa, H. (1993). *Bioactive volatile compounds from plants*. Washington: American Chemical Society.
- Tremblay, J. (1974). *Les huiles essentielles extraites des feuilles de conifères*. (Thèse (Baccalauréat)), Université Laval.
- Tsunetsugu, Y., Park, B. J., & Miyazaki, Y. (2010). Trends in research related to "Shinrin-yoku" (taking in the forest atmosphere or forest bathing) in Japan. *Environmental Health and Preventive Medicine*, *15*(1), 27-37. doi: 10.1007/s12199-009-0091-z.
- Tumen, I., Akkol, E. K., Suntar, I., & Keles, H. (2011). Wound repair and anti-inflammatory potential of essential oils from cones of Pinaceae: preclinical experimental research in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, *137*(3), 1215-1220. doi: 10.1016/j.jep.2011.07.046.

- Urdang, G. (1952). History, origin in plants, production, analysis. In E. Guenther (Ed.), *The essential oils* (Vol. 1, pp. 1). New York, USA: D. Van Nostrand Company, Inc.
- Ustun, O., Senol, F. S., Kurkcuoglu, M., Orhan, I. E., Kartal, M., & Baser, K. H. C. (2012). Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Industrial Crops and Products*, 38, 115-123. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.01.016.
- Vaucher, H. (1993). *Guide des écorces : 530 illustrations*. Neuchâtel: Delachaux et Niestlé.
- Vázquez, G., González-Alvarez, J., Freire, S., López-Suevos, F., & Antorrena, G. (2001). Characteristics of *Pinus pinaster* bark extracts obtained under various extraction conditions. *European Journal of Wood and Wood Products*, 59(6), 451-456.
- Von Rudloff, E. (1962). Gas-liquid chromatography of terpenes VI. The volatile oil of *Thuja plicata* Donn. *Phytochemistry*, 1(3), 195-202.
- Von Rudloff, E. (1967). Chemosystematic studies in the genus picea (Pinaceae): II. The leaf oil of *Picea glauca* and *P. Mariana*. *Canadian Journal of Botany*, 45(9), 1703-1714.
- Von Rudloff, E. (1975). Seasonal variation in the terpenes of the foliage of black spruce. *Phytochemistry*, 14(8), 1695-1699.
- Waffo-Téguo, P., Hawthorne, M. E., Cuendet, M., Mérillon, J.-M., Kinghorn, A. D., Pezzuto, J. M., & Mehta, R. G. (2001). Potential cancer-chemopreventive activities of wine stilbenoids and flavans extracted from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *Nutrition and Cancer*, 40(2), 173-179.
- Waffo-Téguo, P., Lee, D., Cuendet, M., Mérillon, J.-M., Pezzuto, J. M., & Kinghorn, A. D. (2001). Two new stilbene dimer glucosides from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *Journal of Natural Products*, 64(1), 136-138.
- Wang, Y., Catana, F., Yang, Y., Roderick, R., & Van Breemen, R. B. (2002). An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 431-435.
- Warren, C., & Warrenburg, S. (1993). Mood benefits of fragrance. *Perfumer & Flavorist*, 18, 9-16.
- Wender, P. A., Badham, N. F., Conway, S. P., Floreancig, P. E., Glass, T. E., Granicher, C., Houze, J., Janichen, J., Lee, D. & Marquess, D. G. (1997). The pinene path to taxanes. 5. Stereocontrolled synthesis of a versatile taxane precursor. *Journal of the American Chemical Society*, 119(11), 2755-2756.
- White, R. H. (1987). Effect of lignin content and extractives on the higher heating value of wood. *Wood and Fiber Science*, 19(4), 446-452.

- Willför, S., Nisula, L., Hemming, J., Reunanen, M., & Holmbom, B. (2004). Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1: Knots and stemwood of different spruce species. *Holzforschung*, 58(4), 335-344.
- Wise, L. E., & Moore, S. T. (1945). The ether-soluble extractive of black sprucewood. *The Journal of Organic Chemistry*, 10(6), 516-519.
- Woodward, S., & Pearce, R. (1988). The role of stilbenes in resistance of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) to entry of fungal pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 33(1), 127-149.
- Xu, X., Jiang, J., Liang, Y., Yi, L., & Cheng, J. (2010). Chemical fingerprint analysis for quality control of *Fructus Aurantii Immaturus* based on HPLC-DAD combined with chemometric methods. *Analytical Methods*, 2(12), 2002-2010.
- Yang, J., Liang, Q., Wang, M., Jeffries, C., Smithson, D., Tu, Y., Boulos, N., Jacob, M. R., Shelat, A. A. & Wu, Y. (2014). UPLC-MS-ELSD-PDA as a powerful dereplication tool to facilitate compound identification from small molecule natural product libraries. *Journal of Natural Products*, 77(4), 902.
- Yao, C.-S., & Lin, M. (2005). Bioactive stilbene dimers from *Gnetum cleistostachyum*. *Natural Product Research*, 19(5), 443-448.
- Yao, C.-S., Lin, M., Liu, X., & Wang, Y. (2003). Stilbenes from *Gnetum cleistostachyum*. *Acta Chimica Sinica - Chinese Edition*, 61(8), 1331-1334.
- Zellner, B. d. A., Bicchi, C., Dugo, P., Rubiolo, P., Dugo, G., & Mondello, L. (2008). Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(5), 297-314.
- Zhang, X. (2004). Isolation and identification of wood and bark constituents and their toxicological effects (Doctoral dissertation, University of Toronto).
- Zolfaghari, B., & Irvani, S. (2012). Essential oil constituents of the bark of *Pinus pinaster* from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(3), 348-351. doi: 10.1080/0972060x.2012.10644057.
- Zulak, K. G., & Bohlmann, J. (2010). Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 86-97. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00910.x.

Annexes

Annexe 1

Table S1. ANOVA and contrasts statistical experiments, general linear model (GLM) procedure on SAS software. $Pr > F$, the level of significance, has to reach 0.05 (for $\alpha = 5\%$) for the model to be statistically significant. Contrasts are calculated if ANOVA is significant.

Yield dataset

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	17	264.8631472	15.5801851	90.48	<.0001
Error	18	3.0995500	0.1721972		
Corrected Total	35	267.9626972			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	yield Mean
0.988433	2.639783	0.414967	15.71972

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
time	2	1.6524056	0.8262028	4.80	0.0214
ratio	2	153.7944056	76.8972028	446.56	<.0001
time*ratio	4	0.6274611	0.1568653	0.91	0.4786
temp	1	108.0560250	108.0560250	627.51	<.0001
time*temp	2	0.2605500	0.1302750	0.76	0.4836
ratio*temp	2	0.2668167	0.1334083	0.77	0.4756
time*ratio*temp	4	0.2054833	0.0513708	0.30	0.8752

Polyphenol content dataset

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	17	19374.38000	1139.66941	2.39	0.0373
Error	18	8572.19000	476.23278		
Corrected Total	35	27946.57000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	poly Mean
0.693265	4.750446	21.82276	459.3833

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
time	2	1335.255000	667.627500	1.40	0.2718
ratio	2	5180.901667	2590.450833	5.44	0.0142
time*ratio	4	558.558333	139.639583	0.29	0.8785
temp	1	1181.067778	1181.067778	2.48	0.1327
time*temp	2	1891.987222	945.993611	1.99	0.1661
ratio*temp	2	1895.333889	947.666944	1.99	0.1657
time*ratio*temp	4	7331.276111	1832.819028	3.85	0.0198

DPPH activity dataset

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	17	84790.8056	4987.6944	1.07	0.4397
Error	18	83595.5000	4644.1944		
Corrected Total	35	168386.3056			

Proanthocyanidin content dataset

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	17	4088.830000	240.519412	1.36	0.2639
Error	18	3193.640000	177.424444		
Corrected Total	35	7282.470000			

Sugar content dataset

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	17	54528.58250	3207.56368	3.12	0.0106
Error	18	18488.88500	1027.16028		
Corrected Total	35	73017.46750			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	sucr Mean
0.746788	5.437391	32.04934	589.4250

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
time	2	2984.81167	1492.40583	1.45	0.2600
ratio	2	12953.50167	6476.75083	6.31	0.0084
time*ratio	4	15407.39167	3851.84792	3.75	0.0218
temp	1	230.53361	230.53361	0.22	0.6414
time*temp	2	5164.22056	2582.11028	2.51	0.1089
ratio*temp	2	1489.49389	744.74694	0.73	0.4979
time*ratio*temp	4	16298.62944	4074.65736	3.97	0.0177

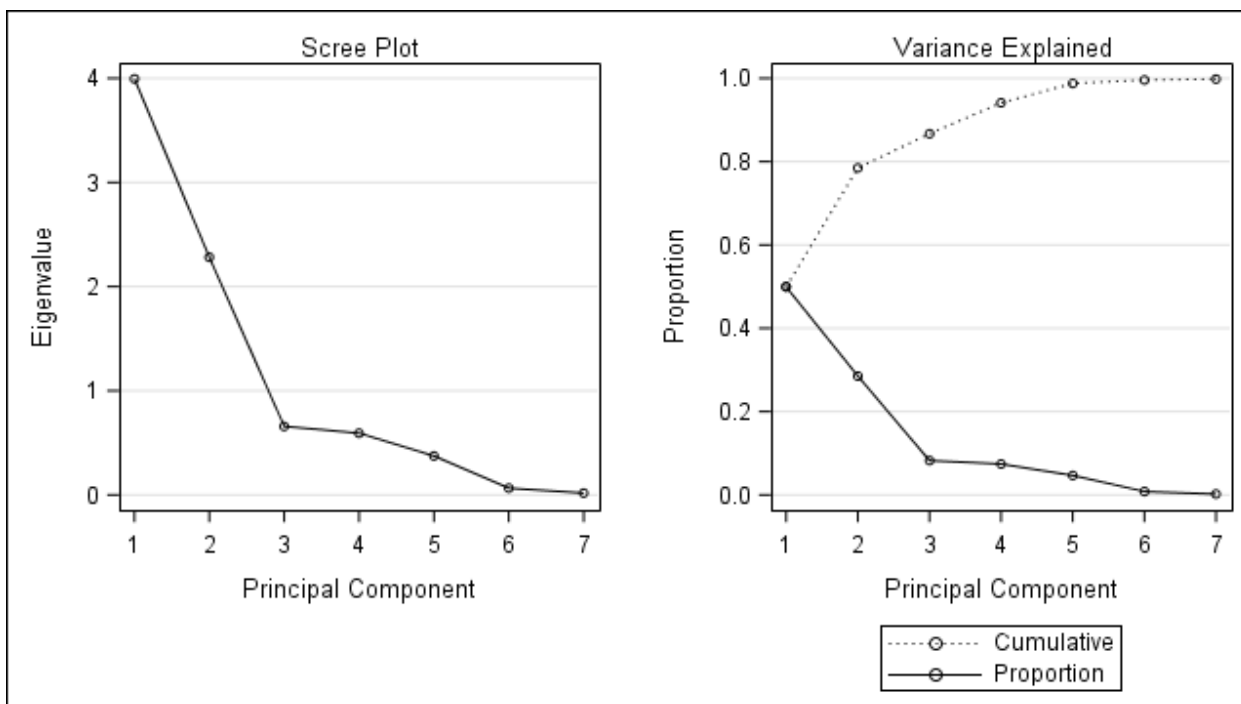


Figure S1: Variance explained for the principal component analysis.

Table S2. Pearson correlation coefficients and *p* values from statistical significance testing (in italics).

Compound	PC1	PC2
1	0.14514 <i>0.3983</i>	0.96254 <i>0.6483</i>
2	0.28258 <i>0.0949</i>	0.93507 <i><.0001</i>
3	0.72520 <i><.0001</i>	-0.35307 <i>0.0347</i>
4	0.86412 <i><.0001</i>	0.02864 <i>0.8683</i>
5	0.89105 <i><.0001</i>	-0.31833 <i>0.0585</i>
6	0.62628 <i><.0001</i>	-0.35908 <i>0.0315</i>
7	0.87583 <i><.0001</i>	0.05693 <i>0.7416</i>
8	0.81732 <i><.0001</i>	0.15916 <i>0.3538</i>

Annexe 2

NMR shifts (^1H and ^{13}C) of compounds **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **7** and **8**.

trans-p-coumaric acid β -D-glucopyranoside (1) : ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.64 (d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.56 (d, $J = 8.8$ Hz, H-2/6), 7.13 (d, $J = 8.8$ Hz, H-3), 7.10 (d, $J = 8.7$, H-5), 6.38 (d, $J = 15.9$, H-8), 4.98 (dd, $J = 7.4, 5.3$ Hz, H-1'), 3.91- 3.37 (Glucose: 3.91 (dd, $J = 12.1, 2.2$ Hz, H-6a'), 3.71 (dd, $J = 12.0, 5.8$ Hz, H-6b'), 3.51 – 3.45 (m, H-2'/3'/5'), 3.43 – 3.37 (m, H-4')). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 169.25 (COOD), 159.39 (C-4), 144.45 (C-7), 129.31 (C-2, 6), 128.56 (C-1), 116.54 (C-3, 5), 116.10 (C-8), 100.43 (C-1'), 76.82 (C-5'), 76.53 (C-3'), 73.42 (C-2'), 69.88 (C4'), 61.04 (C6').

trans-ferulic acid β -D-glucopyranoside (2): ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.62 (d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.26 (d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 7.19 (d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 7.16 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6), 6.41 (d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 4.98 (d, $J = 7.4$ Hz, H-1'), 3.91 (s, CH_3), 3.71- 3.37 (Glucose: 3.70 (dd, $J = 12.1, 5.3$ Hz, H-6a'), 3.53 (dd, $J = 9.2, 7.5$ Hz, H-6b'), 3.50-3.38 (m, H-2', 3', 5')). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 169.24 (COOD), 149.58 (C-3), 148.57 (C-4), 144.67 (C-7), 129.19 (C-1), 121.99 (C-6), 116.45 (C-8), 115.94 (C-5), 110.97 (C-2), 100.77 (C-1'), 76.86 (C-3'), 76.43 (C-5'), 73.38 (C-2'), 69.84 (C-4'), 61.03 (C-6'), 55.32 (CH_3).

trans-astringin (3): ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 6.97 (d, $J = 2.1$ Hz, H-10), 6.95 (d, $J = 16.2$ Hz, H-8), 6.84 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-14), 6.77 (d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 6.72 (br d, $J = 4.8$ Hz, H-13), 6.71 (br s, H-2), 6.56 (t, $J = 1.6$ Hz, H-6), 6.33 (t, $J = 2.2$ Hz, H-4), 4.81 (d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 3.72-3.16 (Glucose: 3.72 (d, $J = 9.6$ Hz, H-6a'), 3.55-3.16 (m, 5H)). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 159.3 (C-3), 158.8 (C-5), 146.1 (C-12), 145.8 (C-11), 139.8 (C-9), 129.4 (C-1), 128.9 (C-8), 125.5 (C-7), 119.2 (C-14), 116.1 (C-13), 113.8 (C-10), 107.5 (C-6), 105.2 (C-2), 103.2 (C-4), 101.1 (C-1'), 77.5 (C-5'), 77.1 (C-3'), 73.7 (C-2'), 70.2 (C-4'), 61.2 (C-6').

trans-piceid (4): ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.39 (d, $J = 8.1$ Hz, H-10, 14), 7.02 (d, $J = 16.4$ Hz, H-8), 6.88 (d, $J = 16.3$ Hz, H-7), 6.75 (d, $J = 8.1$ Hz, H-13, 11), 6.72 (d, $J = 5.5$ Hz, H-2), 6.56 (br s, H-6), 6.33 (br s, H-4), 4.80 (d, $J = 7.7$, H-1'), 3.72– 3.13 (Glucose: 3.72 (d, $J = 11.7$ Hz, H-6a'), 3.48 (dd, $J = 11.89, 5.8$ Hz, H-6b'), 3.41-3.13, (m, 4H)). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 159.3 (C-3), 158.8 (C-5), 157.8 (C-4'), 148.2, 147.2, 139.8 (C-1),

129.0 (C-1'), 128.4 (C-8), 125.6 (C-7), 120.7, 116.0 (C-3', 5'), 107.6 (C-2), 105.1 (C-6), 103.2 (C-4), 101.1 (C-1''), 77.6 (C-3''), 77.2 (C-5''), 73.7 (C-2''), 70.2 (C-4''), 61.1 (C-6'').

trans-isorhapontin (5) : ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.17 (d, $J = 2.0$ Hz, H-10), 7.02 (d, $J = 16.3$ Hz, H-8), 6.96 (dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-14), 6.91 (d, $J = 16.3$ Hz, H-7), 6.75 (d, $J = 8.1$ Hz, H-13), 6.74 (t, $J = 1.7$ Hz, H-2), 6.56 (t, $J = 1.7$ Hz, H-6), 6.33 (t, $J = 2.2$ Hz, H-4), 4.80 (d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 3.82 (s, CH₃O), 5.30-3.16 (Glucose : 5.30 – 5.25 (m, OH-3'), 5.09 (s, OH-2'), 5.05 – 4.99 (m, OH-4'), 4.63 (t, $J = 5.6$ Hz, OH-6'), 3.72 (m, H-6a'), 3.48 (dd, $J = 11.6, 5.6$ Hz, H-6b'), 3.26 (d, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 3.16 (d, $J = 2.7$ Hz, H-4'), 4.63 (t, $J = 5.6$ Hz, OH-6')). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 159.3 (C-3), 158.8 (C-5), 148.2 (C-11), 147.1 (C-12), 139.8 (C-9), 129.3 (C-1), 129.0 (C-8), 126.0 (C-7), 120.7 (C-14), 116.0 (C-13), 110.3 (C-10), 107.7 (C-6), 105.1 (C-2), 103.2 (C-4), 101.1 (C-1'), 77.6 (C-5'), 77.1 (C-3'), 73.7 (C-2'), 70.2 (C-4'), 61.2 (C-6'), 56.1 (CH₃O).

trans-resveratrol (7): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.56 (s, OH-12), 9.20 (s, OH-3, OH-5), 7.39 (d, $J = 8.5$ Hz, H-10, H-14), 6.92 (d, $J = 16.3$ Hz, H-8), 6.81 (d, $J = 16.3$ Hz, H-7), 6.75 (d, $J = 8.5$ Hz, H-11, H-13), 6.38 (d, $J = 2.2$ Hz, H-2, H-6), 6.11 (t, $J = 2.1$ Hz, H-4). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 158.9 (C-3,5), 157.6 (C-12), 139.7 (C-1), 128.5 (C-9), 128.3 (C-10,14,8 overlapping), 126.1 (C-7), 115.9 (C-11, 13), 104.7 (C-2,6), 102.2 (C-4).

trans-isorhapontigenin (8): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.17 (d, $J = 2.0$ Hz, H-10), 6.95 (dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-14), 6.92 (d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 6.86 (d, $J = 16.3$ Hz, H-7), 6.74 (d, $J = 8.0$ Hz, H-13), 6.38 (d, $J = 2.2$ Hz, H-2, 6), 6.11 (t, $J = 2.2$ Hz, H-4), 3.82 (s, CH₃O). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 158.9 (C-3), 158.7 (C-5), 148.2 (C-11), 147.0 (C-12), 139.7 (C-9), 129.8 (C-1), 129.0 (C-8), 126.3 (C-7), 120.6 (C-14), 115.9 (C-13), 110.3 (C-10), 106.8 (C-6), 104.7 (C-2), 102.2 (C-4), 56.1 (CH₃O).