



HAL
open science

Caractérisation et valorisation de matières premières aromatiques : le ciste, la myrrhe et l'encens

Kimberley Massei

► **To cite this version:**

Kimberley Massei. Caractérisation et valorisation de matières premières aromatiques : le ciste, la myrrhe et l'encens. Chimie analytique. Université Côte d'Azur, 2022. Français. NNT : 2022COAZ4096 . tel-04503866

HAL Id: tel-04503866

<https://theses.hal.science/tel-04503866>

Submitted on 14 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



$$\rho \left(\frac{\partial v}{\partial t} + v \cdot \nabla v \right) = -\nabla p + \nabla \cdot \tau + f$$

$$e^{i\pi} + 1 = 0$$



THÈSE DE DOCTORAT

Caractérisation et valorisation de matières premières aromatiques :

le ciste, la myrrhe et l'encens

Kimberley MASSEI

Institut de Chimie de Nice (ICN)

Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en chimie
de l'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Dr. Nicolas Baldovini

Soutenue le : 12 décembre 2022

Devant le jury, composé de :

Carole Prost, Professeure, Université de
Nantes, Rapportrice

Alain Muselli, Professeur, Université de
Corse, Rapporteur

Cornelia Meinert, Directrice de Recherche,
Université Côte d'Azur, Examinatrice
Josep Valls-Fonayet, Maître de Conférences,
Université de Bordeaux, Examineur

Elise Carenini, Responsable Laboratoire
Albert Vieille SAS, Examinatrice



Université Côte d'Azur

École Doctorale de Sciences Fondamentales et Appliquées (EDSFA)

Institut de Chimie de Nice (ICN)

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en chimie de l'Université Côte d'Azur par

Kimberley MASSEI

Caractérisation et valorisation de matières premières aromatiques

Application à l'encens, la myrrhe et le ciste

Dirigée par Dr. Nicolas Baldovini

Soutenue le 12 décembre 2022

Devant le jury composé de :

RAPPORTEURS

Carole Prost, Professeure, Université de Nantes

Alain Muselli, Professeur, Université de Corse

EXAMINATEURS

Cornelia Meinert, Directrice de Recherche, Université Côte d'Azur

Josep Valls-Fonayet, Maître de Conférences, Université de Bordeaux

Elise Carenini, Responsable Laboratoire Albert Vieille SAS

Caractérisation et valorisation de matières premières aromatiques

Application à l'encens, la myrrhe et le ciste

Résumé : Depuis leur apparition sur Terre, les Hommes utilisent les substances naturelles présentes dans leur environnement afin de répondre à leurs besoins vitaux. Ces matières premières, d'origine minérale, végétale ou animale, sont utilisées quotidiennement par les Hommes pour se nourrir, se protéger et s'abriter. Outre ces fonctions essentielles à notre survie, les matières végétales sont utilisées depuis l'Antiquité pour de nombreuses autres vertus : religieuses, curatives et odorantes. Des préparations à base de matières végétales étaient couramment obtenues à partir de fleurs, de plantes aromatiques mais aussi de gommés-résines d'encens, de myrrhe et de labdanum. Aujourd'hui encore, ces exsudats sont utilisés partout dans le monde pour leurs propriétés odorantes et médicinales. Cependant, leur composition phyto-chimique renferme encore de nombreux secrets, et de nombreux composés restent à découvrir et à caractériser. Récemment seulement, les acides olibaniques qui sont les odorants typiques de l'encens, ont été identifiés dans la résine de *Boswellia sacra*. D'autres composés d'encens, à intérêt médicinaux tels que les acides boswelliques, méritent d'être quantifiés dans d'autres espèces d'encens peu étudiées. De même, dans l'huile essentielle provenant de la gomme résine de l'espèce de myrrhe *Commiphora myrrha*, des composés à intérêt olfactif restent à caractériser chimiquement afin de compléter les connaissances de ces plantes. Une autre plante à exsudat méritant d'être étudiée au regard de ses vertus odorantes est le *Cistus ladanifer*, dont la résine «labdanum» entre encore dans la composition de nombreux parfums. Une odeur puissante émane de cette plante typique de notre région méditerranéenne, et une identification exhaustive des odorants la composant est primordiale.

Bien que de nombreux travaux aient été menés afin d'élucider la composition complète de ces résines, beaucoup de composés restent à caractériser et quantifier afin de les valoriser au mieux. Par conséquent, l'étude de ces matières premières aromatiques est aujourd'hui essentielle afin de percer les secrets de leurs vertus tant convoitées. Pour ce faire, diverses techniques d'extraction de ces matières premières (macération, extraction Soxhlet, hydro-distillation), et de séparation de ces composés (flash chromatographie, séparation sur colonne de silice en phase normale ou greffée au nitrate d'argent) ont été employées durant ce travail de thèse. De plus, plusieurs outils analytiques puissants pour identifier, caractériser, quantifier (GC-MS, RMN, GC-Olfactométrie, UHPLC-Orbitrap) et isoler (GC-préparative) ces composés ont été adoptés et optimisés, et seront abordés ici. Dans un premier temps, un chapitre permettant de situer le contexte bibliographique des études menées sur ces trois matières premières sera

présenté. Un second chapitre présentera notre approche analytique afin de caractériser et valoriser les composés non-volatils et semi-volatils de diverses espèces d'encens pour leur intérêt médicinal. Plusieurs méthodes d'extraction et d'analyse des composés d'intérêt médicinal ont été testées, optimisées et adaptées à la nature des composés à identifier. Des tests d'activité enzymatiques ont également été appliqués à plusieurs extraits d'une espèce d'encens, dans le but de la valoriser. Un troisième chapitre permettra de caractériser et quantifier les odorants à fort impact de ces matières premières, grâce à une méthode développée et conçue pour l'analyse de composés à l'état de traces (GC-MS-SIDA), ainsi que par l'utilisation de techniques d'extraction efficaces (Kugelrohr distillation, vacuum distillation). Ce travail s'achèvera par un chapitre comportant une discussion et une conclusion générale portant sur les résultats obtenus au cours des travaux menés durant cette thèse, et ouvrira la discussion sur de futurs travaux et perspectives afin de compléter la caractérisation et la valorisation de diverses matières premières aromatiques.

Mots-clés : caractérisation, GC-MS, olfactométrie, bioactivité, encens, myrrhe, ciste

Characterization and valorization of aromatic raw materials

Application to incense, myrrh and cistus

Abstract: Since their origin on Earth, humans have used natural substances present in their environment to meet their vital needs. These raw materials, of mineral, vegetable or animal origin, are used by human beings every days to feed, protect and shelter themselves. In addition to these essential functions for our survival, plant materials have been used since Antiquity for their numerous virtues: religious, curative and odorant. Preparations based on raw plant material, were commonly obtained from flowers, aromatic plants but also gum-resins of incense, myrrh and labdanum. Even today, these exudates are used all over the world for their odorant and medicinal properties. However, their phytochemical composition still holds many secrets, and many compounds remain to be discovered and characterized. Only recently, the typical note of incense (due to olibanic acids), have been identified in the resin of *Boswellia sacra*. Other constituents of medicinal interest such as boswellic acids, deserve to be quantified in other less known

incense species. Similarly, in the essential oil from the gum resin of the myrrh species *Commiphora myrrha*, compounds of olfactory interest remain to be chemically characterized in order to complete the knowledge of these plants. Another exudate deserving to be studied with regard to its odorant virtues is the one from *Cistus ladanifer*, whose resin "labdanum" still enters in the composition of numerous perfumes. A powerful odor emanates from this typical plant of our Mediterranean region, and an exhaustive identification of the odorants composing it is essential.

Although many works have been done to elucidate the complete composition of these resins, numerous compounds remain to be characterized and quantified in order to make the best use of these resins. Therefore, the study of these aromatic raw materials is essential today to unravel the secrets of their coveted virtues. To that end, various techniques of extraction of these raw materials (maceration, Soxhlet extraction, hydro-distillation), and techniques of separation of these compounds (flash chromatography, separation on silica column in normal phase or grafted with silver nitrate) were used throughout this thesis work. In addition, several powerful analytical tools to identify, characterize, quantify (GC-MS, NMR, GC-Olfactometry, UHPLC-Orbitrap) and isolate (GC-preparative) these compounds have been adopted and optimized, and will be discussed here. In a first step, a chapter allowing to situate the bibliographic context of the studies carried out on these three raw materials will be presented. A second chapter will present our analytical approach to characterize and valorize non-volatile and semi-volatile compounds of various incense species for their medicinal interest. Several methods of extraction and analysis of compounds of medicinal interest were tested, optimized and adapted to the nature of the compounds to be identified. Enzymatic activity tests were also applied to several extracts of an incense species, in order to valorize it. A third chapter will allow to characterize and quantify the high impact odorants of these raw materials, thanks to a method developed and designed for the analysis of trace compounds (GC-MS-SIDA), as well as by the use of efficient extraction techniques (Kugelrohr distillation, vacuum distillation). This work will end with a chapter including a discussion and a general conclusion on the results obtained during the work carried out during this thesis, and will open the discussion on future work and perspectives to complete the characterization and valorization of various aromatic raw materials.

Keywords: characterization, GC-MS, olfactometry, bioactivity, incense, myrrh, rockrose

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier Pr. Carole Prost ainsi que Pr. Alain Muselli d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en tant que rapporteurs, ainsi que Dr. Cornelia Meinert, Dr. Josep Valls-Fonayet et Mme Élise Carenini d'en être les examinateurs. J'apprécie tout particulièrement vos expertises en chimie analytique, en extraction de composés naturels et en composés à intérêt olfactif et/ou médicinal, et je vous adresse donc mes plus sincères remerciements pour m'en avoir fait bénéficier.

Je tiens en second lieu à remercier mon directeur de thèse, Dr. Nicolas Baldovini, qui m'a permis de découvrir la chimie des odorants, et l'intérêt des matières premières aromatiques pour leurs vertus parfumantes, en plus de leur intérêt en chimie médicinale. La transmission de vos compétences en chimie organique m'ont permis de découvrir la chimie de synthèse, et de progresser sur le plan professionnel.

Je remercie particulièrement Clément DSJ, pour ton soutien malgré mes doutes, ton aide précieuse sur ce chemin semé d'embûches, pour la transmission de beaucoup de connaissances... et toujours avec le sourire. Merci pour ton intelligence et ta passion de la recherche, tu es vraiment une personne que j'admire beaucoup.

Je remercie également les membres de l'équipe APSM, et particulièrement du bureau avec mes anciens collègues Adrien et Raph, et de celui d'à côté, pour les moments de rire à l'Institut, de pauses déjeuner à (presque) bronzer, et de gâteaux partagés... Je remercie également Jana et Vanessa pour leur gentillesse, leur bienveillance et leur aide tout au long de ces années.

Je tiens à remercier Thomas Michel pour son avis scientifique, et son regard critique sur mon travail.

Je souhaiterais remercier tous les collègues et amis de l'institut que je n'ai pas cités. Au passage, un petit coucou et un merci également aux pogneurs qui, lorsqu'on a besoin d'une pause, nous attendent pour sûr autour de la table de pogne et nous font oublier nos galères le temps d'un moment.

Je pense aussi à mes anciens collègues, MD et Valapinou, du fameux trio des pépettes, avec qui j'ai partagé tellement de bons souvenirs partout dans le monde, avec qui on a partagé les mêmes galères, et qui sont maintenant mes docteurs en biologie préférés !

J'aimerais remercier ceux avec qui j'ai pu partager des moments inside ICN et surtout outside ICN, je pense à Émilie, Maëva, Adrien et Raph. À nos apéros qui se terminent à l'heure du petit déjeuner, à nos sessions paddle, à nos voitures aux rétro automatiques, à notre camping sauvage bien pensé et surtout le barbecue

dont on a tant rêvé... Un grand merci pour votre soutien. Vous êtes des personnes formidables que je suis heureuse de compter parmi mes amis.

Je remercie également mes amis d'enfance ; Maïlys, Jojo et Alex, Mathieu et Sylvain, pour nos bêtises, nos fous rires, et surtout nos blagues nulles. Je n'en serai pas là aujourd'hui sans votre soutien et votre bienveillance, je sais qu'on pourra toujours compter les uns sur les autres, dans les bons comme les mauvais moments.

Mes avant-derniers remerciements s'adressent à mes parents. Je tenais à vous dire que je suis sincèrement reconnaissante pour tout ce que vous avez toujours fait pour moi, merci pour votre soutien éternel et votre amour inconditionnel. Merci pour votre écoute et vos conseils. En fait, merci pour tout, c'est à vous que je dois tout ce que j'ai aujourd'hui. Vous êtes les plus belles personnes du monde à mes yeux, et j'espère que vous serez fiers de cette thèse comme je suis fière d'avoir des parents aussi exceptionnels que vous. Cette thèse est pour moi l'aboutissement de toutes ces années de travail, et elle n'aurait jamais vu le jour si vous n'aviez pas été là pour moi, pour m'épauler, me rassurer, me pousser. Merci d'avoir été aussi investis, et surtout, merci d'avoir cru en moi.

Enfin, mes derniers remerciements s'adressent à toi, Sébastien. Je tiens à te remercier pour avoir été là au quotidien, pour avoir supporté mes angoisses, mes peurs, mais aussi mes moments de joie tout au long de ces 3 ans. Tu es une personne formidable, qui compte énormément à mes yeux, et je suis heureuse de partager ta vie depuis tout ce temps. À présent, je suis fière de te présenter mon travail, même si tu connais presque aussi bien que moi mon sujet, à force de tout te raconter ! Saches que sans toi, je n'aurai jamais pu faire tout cela, alors merci, c'est grâce à toi.

TABLE OF CONTENTS

List of abbreviations	IX
List of figures	XI
List of tables	XII
PREFACE	1
CHAPITRE I	3
I. Les Matières Premières	4
I.1. Définition et contexte	4
I.2. Histoire de l'utilisation des matières premières en parfumerie, aromathérapie et phytothérapie	4
I.2.A Histoire de la parfumerie	4
I.2.B Histoire de la phytothérapie et de l'aromathérapie	7
I.2.B.a Phytothérapie non médicamenteuse	7
I.2.B.b Aromathérapie et huiles essentielles	10
I.3. Techniques d'obtention d'extraits, d'huiles essentielles et de résinoïdes	10
I.3.A Hydro-distillation et entraînement à la vapeur d'eau	10
I.3.B Extraction solide-liquide	11
I.3.B.a Techniques d'extraction vertes et éco-extraction	12
II. Les plantes à exsudats	12
II.1. Types d'exsudats végétaux	12
II.1.A Plantes à huiles essentielles	12
II.1.B Plantes à résines naturelles	13
II.1.C Plantes à gommés	13
II.1.D Plantes à gommés-résines	14
II.2. Défense des végétaux face à leur environnement biotique	14
II.3. Composition chimique et techniques d'analyse des résines et huiles essentielles	15
II.3.A Biosynthèse de métabolites secondaires d'origine végétale	15
II.3.A.a Terpénoïdes	16
II.3.A.b Composés monophénoliques et autres composés	18
II.3.B Activités olfactives, biologiques et enzymatiques de métabolites secondaires	20
II.3.B.a Activités enzymatiques et chimiques	20
Activité anti-oxydante	20
Activités cosmétiques : test anti-tyrosinase et test anti-élastase	21
Activité anti-inflammatoire	22
II.3.B.b Activité olfactive	23
II.3.C Techniques d'analyses chromatographiques	24
II.3.C.a Analyse et séparation de composés lourds : la chromatographie liquide	24
II.3.C.b Analyse et séparation de composés volatils et semi-volatils : la chromatographie gazeuse	25
Chromatographie en Phase Gazeuse et préparative	25
Chromatographie Gazeuse couplée à l'Olfactométrie	27

II.3.D	Caractérisation des composés	28
II.3.D.a	Caractérisation par Spectrométrie de Masse	28
II.3.D.b	Autres techniques d'analyse et caractérisation	30
III.	Étude de trois plantes à exsudats : l'encens, la myrrhe et le ciste	31
III.1.	L'encens	31
III.1.A	Description taxonomique	31
III.1.B	Description botanique	32
III.1.C	Récolte	32
III.1.D	Composition chimique	33
III.1.E	Usages médicaux, religieux et en parfumerie	33
III.1.F	Problématique	34
III.2.	La myrrhe	34
III.2.A	Description taxonomique	34
III.2.B	Description botanique	35
III.2.C	Récolte et commerce	35
III.2.D	Composition chimique	35
III.2.E	Usages médicaux, religieux et en parfumerie	36
III.2.F	Problématique	37
III.3.	Le ciste	37
III.3.A	Description taxonomique	37
III.3.B	Description botanique	37
III.3.C	Composition chimique	38
III.3.D	Usage en parfumerie et autres rôles	39
III.3.E	Problématique	40
IV.	Objectifs	40
	CHAPITRE II	41
I.	Contexte des études	42
II.	Composés terpéniques lourds à intérêt médical : triterpénoïdes de <i>Boswellia dalzielii</i>	43
II.1.	Introduction	44
II.2.	Materials and methods	44
II.3.	Results and discussion	48
II.4.	Conclusion	56
III.	Composés terpéniques semi-volatils à intérêt médical : diterpènes de <i>Boswellia papyrifera</i>	57
III.1.	Introduction	58
III.2.	Material and methods	58
III.3.	Results and discussion	60
III.4.	Conclusion	65
IV.	Conclusion et perspectives	66
	CHAPITRE III	67

I. Contexte des études	68
II. Étude des odorants de <i>Boswellia sacra</i>	69
II.1. Introduction	70
II.2. Material and Methods	71
II.3. Results and discussion	75
II.4. Conclusion	79
III. Étude des odorants de <i>Commiphora myrrha</i>	80
III.1. Introduction	81
III.2. Material and methods	82
III.3. Results and discussion	86
III.4. Conclusion	95
IV. Étude des odorants de <i>Cistus ladanifer</i>	96
IV.1. Introduction	97
IV.2. Material and methods	97
IV.3. Results and discussion	100
IV.4. Conclusion	111
V. Conclusion et perspectives	112
CONCLUSION & PERSPECTIVES	114
REFERENCES	116
ANNEXES	149

LIST OF ABBREVIATIONS

UV	Ultraviolet
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
GC(-MS)	Chromatographie Gazeuse (couplée à la spectrométrie de Masse)
GC-O	Chromatographie Gazeuse couplée à l'Olfactométrie
NIF	Nose Impact factor
AEDA	Aroma Extract Dilution Analysis
SIDA	Stable Isotope Dilution Assay
LC(-MS)	Chromatographie Liquide (couplée à la spectrométrie de Masse)
(U)HPLC	Chromatographie Liquide (Ultra)-Haute-Performance
MS	Spectrométrie de Masse
NMR	Résonance Magnétique Nucléaire
HRMS	Spectrométrie de Masse à Haute Résolution
Quad	Quadripôle
-WAX	Phase stationnaire de polyéthylène glycol
HP-1 (-5)	Phase stationnaire méthylpolysiloxane (+ 5% phényl)
FFAP	Polyéthylène glycol modifié à l'acide nitrotéréphtalique
EI	Impact Électronique
ESI	Ionisation par Électro Spray
FID	Détecteur à Ionisation de Flamme
PFC	Collecteur préparatif de fractions
PSD	Preparative Switching Device
MCS	Multiple Column Switching System
<i>m/z</i>	Ratio masse sur charge
LOD	Limite de Détection
LOQ	Limite de Quantification
TIC	Total-ion current
SIM	Single Ion Monitoring
NIST	National Institute of Standards and Technology
(L)RI	Indice de Rétention (Linéaire)
AcetylCoA	Acétyl Co-enzyme A
DMAPP	Diméthylallyl-pyrophosphate
IPP	Isopentényl-pyrophosphate
MEP	Méthylérythritol phosphate
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-CoA
FDS	Fiche de Données Sécurité
EFSA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail
IFRA	International Fragrance Association
CE	Conformité Européenne
INSEE	Institut National de la Statistique et des Études Économiques
PPAM	Plantes à Parfums Aromatiques et Médicinales
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
DPPH	2,2-diphényl 1-pyrcrilhydrazyle
LOX	Lipoxygénase
BA	Acide boswellique
KBA	Acide kéto-boswellique
11OHABA	Acide boswelliques 11-hydroxy-acétylé
PTA	Acides Triterpéniques Pentacycliques
EO	Essential Oil

LIST OF FIGURES

Figure 1 : Odorants issus de végétaux, responsables des notes typiques des matières représentées.	7
Figure 2 : Schéma de principe de la distillation.	11
Figure 3 : Schéma de la voie biosynthétique des isoprénoïdes.	17
Figure 4 : Schéma de la voie biosynthétique des phénylpropanoïdes.	19
Figure 5 : Réaction chimique permettant le transfert d'hydrogène de l'anti-oxydant (A-H) au DPPH, en violet.	21
Figure 6 : Photographie d'une GC couplée à un collecteur préparatif de fractions.	26
Figure 7 : Représentation schématisée d'un PSD.	27
Figure 8 : Classement phylogénétique des Burseraceae.	31
Figure 9 : Photographie d'un jeune arbre à encens <i>B. sacra</i> .	32
Figure 10 : Structure des principaux composés volatils de <i>B. papyrifera</i> .	33
Figure 11 : Photographie d'une résine de <i>C. myrrha</i> .	35
Figure 12 : Photographie d'un ciste à gomme <i>C. ladanifer</i> .	38
Figure 13 : Composés volatils majoritaires chez <i>C. ladanifer</i> .	39
Figure 14 : Inhibitory activities of fractions or extracts of <i>B. dalzielii</i> on DPPH radical, or on elastase, lipoxygenase or tyrosinase enzymes.	54
Figure 15 : Anti-inflammatory activity of fractions or extracts of <i>B. dalzielii</i> .	55
Figure 16 : Graphic representation of the mass of essential oil of <i>B. papyrifera</i> obtained over time.	60
Figure 17 : GC-MS chromatograms of compounds found in 3 fractions obtained from the essential oil of <i>B. papyrifera</i> .	61
Figure 18 : Flowchart representing the fractionation steps of <i>B. papyrifera</i> distillate from Kugelrohr.	63
Figure 19 : GC-MS chromatograms of fractions PE and PE/DE 95-5 from <i>B. papyrifera</i> kugelrohr distillate.	64
Figure 20 : GC-MS chromatograms of sub-fractions of PE fraction from <i>B. papyrifera</i> kugelrohr distillate.	65
Figure 21 : Reagents and conditions.	72
Figure 22. Evolution of EO and olibanic acids extraction in function of hydrodistillation duration.	75
Figure 23 : Olibanic acids concentration (ppm) in <i>B. sacra</i> samples from different origins. (n=2)	79
Figure 24 : Odoriferous compounds found in myrrh.	82
Figure 25 : Flowchart of myrrh oil fractionation steps.	84
Figure 26 : GC-SNIF olfactogram of myrrh essential oil (10%).	87
Figure 27 : GC-MS chromatograms of neutral part of myrrh oil, and DE fraction of neutral part of myrrh oil after thermal treatment.	92
Figure 28 : GC-MS chromatogram of the head of distillation of myrrh neutral oil, fraction F1. Compounds numbers reported correspond to the odor zones from the olfactogram.	93
Figure 29 : GC-MS chromatograms of neutral part of myrrh oil without the head of distillation, and its most fragrant «1-1 fraction».	94
Figure 30 : Structure of compound I, determined following NMR analyses.	94
Figure 31 : GC-SNIF olfactogram of <i>Cistus ladanifer</i> var <i>beta maculata</i> essential oil (10%).	101
Figure 32 : Flowchart representing the different steps of fractionation of <i>C. ladanifer</i> essential oil.	102
Figure 33 : GC-MS chromatograms of <i>C. ladanifer</i> carbonylated and non-carbonylated fractions.	107
Figure 35 : GC-MS chromatograms of <i>C. ladanifer</i> fractions.	109
Figure 37 : GC-MS chromatograms of <i>C. ladanifer</i> fractions from carbonylated part.	110

LIST OF TABLES

Table 1 : Comparaison de méthodes analytiques utilisées couramment en métabolomique d'après [112]......	Error!
Bookmark not defined.	
Table 2 : Constituents of the essential oil of <i>Boswellia dalzielii</i>	50
Table 3 : Concentrations of pentacyclic triterpenic acids in <i>Boswellia</i> oleogum resins, and reported concentrations found in the literature for <i>B. dalzielii</i> resin.	52
Table 4 : Constituents of the Kugelrohr distillate of <i>Boswellia papyrifera</i>	62
Table 5 : Intra-day and inter-day precision.	77
Table 6 : Accuracy measurement.	77
Table 7 : Average concentration of olibanic acids in essential oils samples.	78
Table 8 : Constituents of the essential oil of <i>Commiphora myrrha</i>	88
Table 9 : Constituents of the essential oil of <i>Cistus ladanifer</i>	102
Table 10 : Supposed compounds responsible of odor zones of <i>C. ladanifer</i>	108

PREFACE

Les matières premières végétales sont utilisées depuis toujours par les Hommes, pour leurs nombreuses propriétés : olfactives, médicinales ou nutritives. Des matières telles que les résines de myrrhe, d'encens ou encore de ciste font partie de ces matières végétales anciennement utilisées pour ces propriétés. Cependant, malgré leur utilisation et leur commercialisation depuis des millénaires, la composition de ces résines est encore peu connue, et mérite d'être approfondie sur le plan analytique afin d'enrichir la culture scientifique sur les matières premières anciennes et traditionnellement utilisées. De plus, certaines espèces de plantes produisant ces résines sont moins communes, et de ce fait, méritent, elles aussi, que leurs compositions soient investiguées.

Par ailleurs, ces plantes ont un fort intérêt olfactif, et sont même encore utilisées à ce jour en parfumerie. Cependant, les odorants les plus représentatifs de l'odeur globale de ces matières ont seulement été investigués et/ou découverts récemment, comme c'est par exemple le cas pour l'encens, dont les composés odorants majeurs ont été élucidés en 2016. Ainsi, pour mieux utiliser ces matières en parfumerie et en agro-alimentaire, il est nécessaire de connaître leurs compositions et leur teneur en certains composés olfactifs ainsi que leurs notes olfactives respectives. De plus, l'étude de ces matières odorantes est nécessaire puisque peu de littérature existe à propos des odorants d'impact de celles-ci, et divers types d'analyses sensorielles peuvent être mis en application. Par ailleurs, certaines espèces moins communes mais utilisées localement ont également une composition qui peut différer, et les études sur ces espèces sont largement minoritaires et valent donc la peine d'être également étudiées.

D'autre part, ces plantes et leurs exsudats sont depuis longtemps employées pour traiter de nombreux maux et troubles physiologiques, et mieux connaître leurs propriétés, ainsi que les composés permettant certaines bioactivités permettrait de mieux valoriser ces résines. De plus, certains brevets ont même été déposés pour des applications pharmaceutiques de ces plantes. Cependant, les espèces principalement étudiées pour ces propriétés médicinales sont les plus commercialisées, mais ne sont pourtant pas les seules à en être pourvues. Ainsi, d'autres espèces utilisées plus localement et/ou moins connues justifient aussi d'une étude de leurs bioactivités, et nécessitent également d'être observées pour leur teneur en certains composés bioactifs, déjà connus dans le même genre ou la même famille génétique, voire même dans d'autres familles de plantes recensées dans la littérature.

En somme, parvenir à percer les secrets de ces matières végétales exploitées depuis la nuit des temps pour leurs diverses vertus et leurs nombreux usages implique d'effectuer des investigations poussées sur leur composition chimique. Pour ce faire, des techniques analytiques performantes dans le but d'extraire, isoler et caractériser structurellement et olfactivement leurs constituants ont été employées dans ce travail.

CHAPITRE I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce premier chapitre a pour but de présenter le contexte bibliographique concernant les matières premières et substances naturelles étudiées durant cette thèse. Dans un premier temps, un point sur l'Histoire des préparations parfumées ainsi que sur l'Histoire de la phytothérapie et de l'aromathérapie sera présenté, avant une discussion sur les extraits et leurs techniques d'obtention. Suite à cela, un état de l'art sera fait sur les exsudats végétaux, puis sur les différentes techniques utilisées leur caractérisation et leur valorisation, avant de finir par quelques généralités sur les plantes étudiées durant cette thèse.

I. LES MATIERES PREMIERES

I.1. Définition et contexte

Les matières premières sont issues de produits bruts naturels et qui, souvent, sont l'objet d'une transformation artisanale ou industrielle. Elles peuvent être d'origine végétale, animale, minérale ou microbienne. Les techniques destinées à la production des matières premières d'origine végétale ont considérablement évolué au fil du temps. Elles peuvent provenir de la transformation de diverses parties de plantes telles que les parties aériennes (fleurs, fruits, graines, feuilles, tronc, bourgeons) ou souterraines. Ces matières premières sont encore utilisées aujourd'hui pour la fabrication de produits finis, telles que les préparations parfumées, médicinales ou aromatiques [1].

En France, le marché des plantes à parfums, aromatiques et médicinales (PPAM) ne cesse de croître. On peut observer une forte demande des consommateurs pour des produits végétaux et des substances naturelles, pour un usage thérapeutique, alimentaire ou en cosmétique. D'après un rapport de l'Institut technique interprofessionnel des plantes (iteipmai), une augmentation d'environ 85% du chiffre d'affaires des PPAM a été observé depuis les années 2000, atteignant un chiffre d'affaires s'élevant à 26 447 k€ en 2021, toutes matières premières végétales confondues [2]. Les matières premières d'origine animale ont également eu une place importante depuis les débuts de l'Histoire de la parfumerie, et en médecine traditionnelle (chinoise et ayurvédique notamment). Elles sont cependant de moins en moins utilisées, voire même parfois bannies, notamment en Europe.

Selon l'INSEE, la France est le premier producteur européen de parfums et produits pour la toilette. Avec une production s'élevant à 9,1 milliards d'euros en 2015, soit 32 % de la production européenne [3]. Aujourd'hui, de nombreuses plantes sont utilisées en parfumerie, avec des fleurs telles que la rose, le jasmin, la tubéreuse ou encore la lavande. Les fruits et autres parties aériennes de plantes (agrumes, géranium, patchouli, santal, mousses) ainsi que les racines (iris) sont aussi utilisées, de même que les exsudats végétaux (résines et gommés résines) tels que le labdanum, l'encens et la myrrhe.

I.2. Histoire de l'utilisation des matières premières en parfumerie, aromathérapie et phytothérapie

I.2.A *Histoire de la parfumerie*

Les premières traces de parfum recensées datent de l'âge de bronze, et auraient pour origine la Mésopotamie et le Levant. D'après certains documents archéobotaniques, de nombreux arbres tels le cyprès, le cèdre, le genévrier ou les *Pistacia spp*, étaient utilisés dans les préparations odorantes. Bien que les premiers flacons à parfum retrouvés dans le Levant datent du septième millénaire avant J.C., en Iran, l'utilisation dans des brûle-parfum de résines comme l'encens semble remonter au quatrième millénaire avant J.C. [4]. Certaines recettes retrouvées gravées sur des pierres du laboratoire d'Edfou mentionnent

d'ailleurs l'utilisation de la myrrhe et l'encens [5]. Par ailleurs, des vestiges d'alambics ancestraux ont aussi été retrouvés et datés d'au moins 3000 ans avant J.C [6]. À cette époque, le parfum apparaît sous forme d'huile parfumée obtenue par macération à froid, cuisson ou ébullition de diverses matières premières, mises dans de l'huile de sésame ou de carthame [7].

Durant l'Égypte ancienne, les parfums et fumées odorantes étaient un moyen de communiquer avec les dieux, et la myrrhe et l'encens étaient utilisés en fumigation pour le culte religieux [8]. D'après les écrits, on croyait que la fumée d'encens qui montait aux cieux était le signe de l'acceptation par les dieux de ces présents, transmis par la fumée. Les divinités étaient célébrées tout au long de la journée, et différentes offrandes brûlées comme le *kyphi* leur étaient offertes [9,10]. Hérodote a d'ailleurs mentionné que la myrrhe et l'encens étaient importées par la route de l'encens, qui s'étendait de l'Inde à l'Égypte, en passant par les contrées voisines de la mer Rouge [11]. Par ailleurs, le parfum était associé à la vie et à la mort, et était largement utilisé pour la momification. On remplissait les corps des morts d'aromates broyés, de myrrhe, de cannelle et d'autres parfums [12]. La culture religieuse et le passage vers l'au-delà n'étaient cependant pas les seules façons d'utiliser des matières odorantes. Les plus riches, tels que les pharaons, avaient pour coutume de se parfumer le corps. À l'époque, les préparations parfumées sous forme d'huiles avaient des vertus supposées purificatrices. Ainsi, les femmes s'enduisaient de ces huiles et de maquillage pour le plaisir et la séduction [9].

En Grèce antique, le parfum était également utilisé dans la vie quotidienne pour l'hygiène et la beauté féminine, et selon la croyance, l'odeur des roses leur était même offertes par Aphrodite afin de prévenir la vieillesse. Les femmes utilisaient le parfum à petites doses pour leur toilette quotidienne, mais plus abondamment lors de leurs mariages ou de naissances. Les parfums embaumaient également les lieux de réception, où les invités, et notamment les femmes, s'appliquaient à se maquiller et se parfumer. Dans l'univers masculin, le parfum était également très largement présent, surtout lors des *symposion*, des fêtes grecques réservées aux hommes et où ils buvaient ensemble pour diverses occasions festives [13]. Des boutiques de parfumerie datant de la période hellénistique ont même été découvertes [14]. L'ambrosie était souvent utilisée dans les rites religieux pour perpétuer l'immortalité des dieux. Elle était à la fois une source de nourriture, un remède mais aussi un parfum selon Plutarque [15]. Les compositions parfumées telles que le *sousinon* étaient composées d'huiles (olive, amande et sésame) et graisses animales, dans lesquelles étaient laissées macérer des fleurs telles que l'iris, la rose, la marjolaine et le lys. Ainsi, les prémices de la technique de l'enfleurage étaient déjà connus [16]. D'autres techniques de macération à chaud et dans du vin par exemple, étaient également employées [9,17]. En outre, les matières premières d'origine animale (musc, civette et ambre gris) étaient aussi communes.

En Asie, et notamment en Inde durant l'Antiquité, le traité de la parfumerie « *Gandhasāstra* » mentionne l'utilisation de substances aromatiques végétales (racines de costus Indien, myrrhe) et d'épices (safran, camphre, santal), et date d'environ 1200 avant J.C. [18]. Des fleurs odorantes telles que les fleurs de frangipanier, la tubéreuse, la rose ou encore le jasmin étaient offertes aux dieux ou mises sur soi et dans les maisons [9]. Des huiles, des onguents, des fumigations d'encens, mais aussi des pâtes à mâcher composées de musc et de santal étaient aussi utilisées.

Après l'Antiquité, la civilisation de l'Empire romain a davantage fait évoluer l'Histoire de la parfumerie, grâce au commerce qui s'est largement développé à la suite de conquêtes de nouveaux territoires par Alexandre le Grand, et a donc subi une « révolution parfumée » [10]. De nouvelles épices, telles que le safran, ont pu être utilisées pour l'hygiène quotidienne et dans les thermes [19]. À cette époque, en Arabie

préislamique, le parfum est utilisé pour le culte religieux mais était aussi un symbole de richesse. Dans l'« Arabie Heureuse », la myrrhe et l'encens étaient produites en abondance et faisaient l'objet d'échanges commerciaux avec le monde méditerranéen [7]. Utilisé en fumigations, l'encens accompagnait la célébration de cérémonies religieuses. Le Prophète Mahomet recommandait d'ailleurs aux fidèles de se parfumer, avec par exemple des matières premières telles que le camphre, l'ambre gris, le bois d'aloès ou encore le musc [9].

En Europe, dès le 12^{ème} siècle, la quête de nouvelles odeurs et fragrances est toujours présente, et le développement du commerce international permet l'arrivée de parfums venus du monde entier. Les bains sont quotidiens, et reflètent une bonne hygiène de vie et le bien-être. On continue d'importer des résines telles que l'encens et la myrrhe, ainsi que des épices et des eaux parfumées. Cependant, au Moyen âge, les pays Occidentaux sont frappés par l'épidémie de peste noire, et les parfums sont de moins en moins employés. En effet, selon la théorie putride des odeurs, on croyait que les odeurs permettaient aux maladies de se transmettre par la peau et de se répandre plus vite [20]. L'hygiène est alors déplorable, et les bains sont perçus comme dangereux.

À la Renaissance, le parfum sert à pallier le manque d'hygiène corporelle, en camouflant les odeurs. En 1370, l'eau de la reine de Hongrie est le premier parfum alcoolique, créé avec des notes fraîches, agrumes et aromatiques à base de fleur d'oranger, citron, menthe et romarin [21]. Les parfums suivants ont des notes proches de celles de l'eau de la reine de Hongrie, mais aussi des tonalités puissantes et animales obtenues avec l'ambre, le musc et la civette.

À cette période, les fumigations et effluves odorantes servaient à purifier et à lutter contre les maladies, à tel point que lors de fêtes publiques, on pouvait humer les effluves se dégageant des fontaines publiques parfumées. Au 16^{ème} siècle, la France verra naître sa première capitale de la parfumerie, Montpellier, grâce à son école de pharmacie et à la production locale d'huiles essentielles et autres senteurs. En même temps, à Grasse, les maîtres gantiers parfumeurs s'attelaient à parfumer les peaux, afin de camoufler leurs odeurs désagréables du cuir fraîchement tanné. Du fait de ces activités et du climat plus propice pour la production de plantes aromatiques, la ville de Grasse devint la capitale de la Parfumerie peu de temps après [7].

C'est au 18^{ème} siècle, que les « parfumeurs des Lumières » prendront la place des gantiers parfumeurs, en confectionnant eux-mêmes toute sortes de parfums, qu'ils emploieront pour confectionner des poudres, des pâtes, des savons ou encore des produits pour cheveux. Cette période a aussi été marquée par un usage excessif des parfums, à tel point que la royauté elle-même en était écœurée. Il faudra attendre la fin de la Révolution pour que l'hygiène corporelle soit de nouveau mise en avant. Dès lors, des senteurs plus gourmandes furent créées, avec des notes d'amande, de miel ou de bergamote, comme dans l'eau de Cologne. La France intensifiera son commerce du parfum et verra naître de grands parfumeurs, cependant, leurs produits resteront un luxe réservé à l'aristocratie et à la bourgeoisie [9,22].

Après la révolution industrielle, la mécanisation des machines, le développement de nouvelles techniques d'extractions ou l'amélioration des procédés classiques ont permis la création d'extraits de parfums, d'eaux de toilette, ou encore la fabrication de savons à chaud. À la fin du 19^{ème} siècle, l'extraction des matières premières aux solvants volatils a également révolutionné la parfumerie, avec l'obtention d'absolues et d'extraits concentrés en odorants. Par ailleurs, l'apparition des molécules synthétiques, comme la coumarine en 1860, a également contribué à l'essor de nouveaux parfums. S'en est suivi

l'isolement et la synthèse d'autres composés odorants tels que la vanilline, l'anéthole, l'héliotropine ou encore l'ionone, jusqu'à la fin du 19^{ème} siècle [9,23].



Figure 1 : Odorants issus de végétaux, responsables des notes typiques des matières représentées. De gauche à droite, de haut en bas sont montrés les composés issus de girofle, cannelle, anis étoilé, vanille, violette.

Depuis les années 20, jusqu'à avant-guerre, une palette d'odeurs extrêmement riches et diverses, a permis la création de parfums qui ont marqué l'Histoire de la parfumerie. Au milieu du 20^{ème} siècle, la parfumerie française était à son apogée et était aussi associée à la mode et au luxe. Des couturiers parfumeurs travaillaient alors pour de grandes maisons telles que Chanel, Lanvin ou encore Yves Saint-Laurent.

De nos jours, les produits cosmétiques sont définis selon la réglementation (CE) n°1223/2009 du Parlement européen qui régit les produits cosmétiques et leur mise sur le marché. Le parfum étant un produit cosmétique, il est également soumis à cette réglementation entrée en vigueur en 2013. En parfumerie, c'est l'association internationale du parfum (IFRA) qui spécifie les conditions d'utilisation de certains ingrédients utilisés dans les préparations parfumées. Afin d'être mis sur le marché, le parfum devra respecter les exigences du Règlement (CE) 1223/2009, et un certificat « allergènes » du produit, ainsi que la Fiche de Données Sécurité du produit doivent l'accompagner.

1.2.B *Histoire de la phytothérapie et de l'aromathérapie*

1.2.B.a *Phytothérapie non médicamenteuse*

On entend par le terme phytothérapie, le traitement curatif ou préventif des différents maux humains, à partir de plantes ou médicaments à base de plantes. Dans cette partie, et les suivantes, ne seront traités que les préparations non médicamenteuses.

C'est dès l'Antiquité qu'apparaissent les premiers recueils traitant des plantes et de leurs usages pour application médicale. Le texte le plus ancien connu à ce jour fût rédigé environ 3000 ans avant J.C. À

l'intérieur de cet ouvrage, des plantes telles que le chanvre, le saule ou le thym pour traiter les plaies et les maladies de peau, étaient déjà mentionnées par les Sumériens pour ces usages [24]. En Égypte et Grèce antique, ce sont les prêtres qui possédaient les connaissances de l'utilisation de plantes médicinales, et c'est ainsi auprès d'eux que se recueillait la population. Un des ouvrages les plus connus à ce jour est le papyrus égyptien d'Ebers, datant d'environ 1500 avant J.C., qui établit une liste de centaines de plantes et leurs utilisations. On peut y lire des utilisations de la myrrhe pour la momification et de l'encens pour traiter les plaies et maladies de peau, par exemple [25]. De même, le « Huangdi Nei Jing » est le plus ancien ouvrage de médecine traditionnelle chinoise connu à la fin de l'Antiquité. L'utilisation des plantes en médecine traditionnelle (Chinoise, Ayurvédique, Tibétaine) mais aussi chez les peuples autochtones d'Afrique, d'Océanie et d'Amérique est très courante, et installée dans les cultures depuis des millénaires. Ainsi, beaucoup de plantes étaient déjà utilisées traditionnellement par des « guérisseurs », telles que l'échinacée ou encore l'harpagophytum [26]. Durant la Rome antique, d'autres médecins tels que Hippocrate qui élaborait la théorie humorale, Dioscorides avec son ouvrage « *De Materia Medica* » ou encore Galien complètent à leur tour cette liste de plantes curatives : c'est ainsi que naît la première pharmacopée. Au Moyen-Âge, les ouvrages à base de plantes médicinales les plus connus ont été rédigés par la guérisseuse et abbesse Hildegarde Von Bingen, au 12^{ème} siècle. Le *Liber simplicis medicinae* décrit alors 513 animaux, plantes, éléments, métaux et pierres, utilisés pour leurs propriétés médicinales [27].

Malgré les nombreuses controverses et débats autour de ses écrits, Paracelse a joué un rôle considérable dans l'Histoire de la médecine de la Renaissance, en tentant d'extraire les principes actifs des narcotiques (soi-disant incluses dans son médicament, le laudanum), et en posant les bases de la toxicologie moderne avec ses travaux sur les poisons [28,29]. Cependant, nombreux sont les travaux qu'il relate mais qui furent les découvertes d'autres chercheurs de l'époque, comme par exemple, la connaissance des propriétés analgésiques des éthers, attribuées à Cordus [30,31]. La théorie des signatures a également été redéfinie par Paracelse, bien qu'existant depuis des millénaires, et nous dit alors que Dieu aurait signé les plantes à travers une odeur, une couleur ou une forme, et que, par analogie, une plante d'une certaine forme, pourrait soigner un organe de la même forme. À cette théorie s'opposait la loi des contraires, mise en avant au 19^{ème} siècle où il était question d'administrer un remède qui s'opposait aux symptômes ou aux causes de la maladie [24].

Le concept de la phytothérapie a été introduit par le médecin parisien Henri Leclerc, au 20^{ème} siècle. Il a publié divers ouvrages sur l'utilisation des plantes médicinales, dont le plus connu « Précis de Phytothérapie » révèle et énumère toutes les connaissances qu'il a acquises sur les plantes médicinales [26]. Au fil du temps, et durant de nombreux siècles, la phytothérapie était le seul remède contre les maladies, les médicaments n'étant apparus qu'avec la naissance de la chimie moderne et des premiers médicaments. Au 18^{ème} siècle, les premières molécules actives ont pu être isolées des végétaux, telles que la morphine dans l'opium en 1817 par F. Sertürner. À la fin du 19^{ème} siècle, la découverte de l'effet antibiotique de moisissures de *Penicillium* fût également un tournant dans l'Histoire de la médecine. Avec le progrès de la chimie organique, les premières molécules actives ont également pu être synthétisées dans les années 60, et introduites dans les médicaments, comme par exemple l'acide salicylique (antalgique) extraite du saule blanc (*Salix alba L.*), le taxol (anti-cancéreux provenant de l'If commun, *Taxus baccata*) ou l'artémisinine, un composé anti-paludéen provenant de *Artemisia annua* [32–34]. Encore aujourd'hui, la nature fournit à l'Homme la plus grande source de médicaments [24].

Dès lors, avec l'apparition de traitements médicaux et autres spécialités pharmaceutiques, on a pu observer le recul de l'usage de la phytothérapie dans les pays développés. Or, avec de plus en plus d'effets

secondaires constatés lors de la prise de médicaments, les plantes médicinales ont suscité un regain d'intérêt dans la population. À ce jour, la phytothérapie, les compléments alimentaires et les huiles essentielles sont considérés comme étant une médecine plus « naturelle » et sont en plein essor. Les connaissances scientifiques et l'éducation de la population sur les usages, fonctions, et mécanismes d'action de certains composés végétaux, participent à cette croissance. Pour la plupart des gens, la phytothérapie est aussi une tradition, et implique de façon implicite, une proximité avec la nature. Avec un marché des compléments alimentaires qui ne cesse de croître de par l'allongement de l'espérance de vie de la population, et la compréhension des liens entre alimentation et santé, des contrôles doivent être mis en place pour garantir la sécurité des consommateurs. En France, l'autorité principale en charge de qui la régulation des compléments alimentaires est l'ANSES, et au niveau européen c'est l'EFSA qui en est en charge.

En outre, l'organisation Mondiale de la Santé estimait que près de 80% de la population des pays en développement utilisaient presque exclusivement des préparations à base de plantes, déjà utilisées en médecine traditionnelle depuis des millénaires [35]. L'avancée de cette « médecine naturelle » a été permise grâce à un marché toujours plus riche et diversifié, grâce à la découverte de nouveaux principes actifs issus du végétal, des algues, des champignons ou encore des organismes marins. De plus, les nouvelles technologies, l'augmentation des connaissances en phytochimie et les avancées en agronomie ont permis la mise sur le marché de nouveaux produits avec diverses formes galéniques, toujours plus efficaces. Ces plantes peuvent être utilisées sous forme de tisanes et décoctions, de macération, mais aussi sous forme de poudres de plantes et d'extraits secs [36].

Les plantes médicinales sont inscrites dans la pharmacopée européenne, et révisées régulièrement. Certaines sont mentionnées comme étant utilisables en homéopathie, médecines traditionnelles, alors que d'autres sont strictement défendues. En 2007, on comptait près de 200 plantes qui disposaient d'une monographie de contrôle. La vente de ces plantes est réglementée, ainsi, certaines ne peuvent être vendues librement qu'en pharmacie, alors que d'autres peuvent être incluses dans les compléments alimentaire et autres produits de phytothérapie non médicamenteux [37]. Depuis 2014 a été établie une liste de plantes (ca. 550 plantes, liste BelFrit) pouvant être inscrites à la pharmacopée européenne pour usage thérapeutique et utilisation dans des compléments alimentaires.

De nos jours, les principales pathologies traitées par la phytothérapie sont l'inflammation, les douleurs articulaires (rhumatismes, tendinites), le vieillissement cellulaire, les problèmes de circulation sanguine et de tension, ou encore les troubles diurétiques. Afin d'assurer le bien-être, la phytothérapie peut être utilisée pour redonner de la vitalité, prévenir du mal des transports, calmer les migraines et le stress ou encore stimuler les défenses immunitaires. Plus récemment, des produits de phytothérapie et aromathérapie sont arrivés sur le marché, et touchent cette fois ci autant au bien-être qu'à une volonté de modification du soi, avec la mise en vente de produits amincissants ou favorisant la prise de poids, pour calmer les rougeurs et autres problèmes cutanés, fortifier les cheveux et ongles et booster leur croissance [36]. Certains composés de plantes ont également montré des propriétés antifongiques ou antimicrobiennes, notamment avec l'emploi d'huiles essentielles pour préserver les préparations cosmétiques de diverses contaminations microbiennes. Parallèlement à leur emploi en cosmétique et parfumerie, les huiles essentielles sont aussi largement utilisées en aromathérapie.

I.2.B.b Aromathérapie et huiles essentielles

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie, permettant de traiter certains troubles ou maladies par l'usage de produits issus de plantes et composés exclusivement de composés volatils, tels que les huiles essentielles. Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés volatils, principalement des terpénoïdes ou phénylpropanoïdes, obtenus par distillation ou expression à froid. Elles peuvent être utilisées en cosmétique pour leur fragrance ou leurs propriétés biologiques (conservatrices, anti-microbiennes, etc.) ou en phytothérapie et aromathérapie, pour leur usage médicinal. En effet, elles possèdent de nombreuses propriétés biologiques, établies par plusieurs travaux disponibles dans la littérature. Par exemple, les huiles essentielles d'encens ont également montré des propriétés anti-microbiennes et anti-insectes [38,39]. En aromathérapie, elles s'utilisent par inhalation (diffusion atmosphérique ou fumigation), dans des bains, en application cutanée (massage, réflexologie), en compresses et enveloppements, et dans la toilette [40,41].

Environ 300 plantes sont utilisées aujourd'hui en aromathérapie, et les huiles essentielles issues de ces plantes ont des compositions variables, dues à la variété de plante utilisée, ou à des facteurs biotiques ou abiotiques qui font varier les teneurs en certains composés de la plante. Les prix varient beaucoup selon la plante utilisée, et certaines huiles sont très onéreuses, comme par exemple celle de rose puisque pour obtenir un kilogramme d'huile essentielle, il faut compter autour de 3.5 tonnes de fleurs [42].

L'utilisation des huiles essentielles ne doit cependant pas être excessive, et doit être respectée selon les allégations mentionnées sur le produit. En effet, certaines huiles essentielles contiennent des substances allergisantes, néphrotoxiques, ou encore photosensibilisantes, et doivent de ce fait être utilisées avec précaution. De plus, les huiles essentielles faisant partie des cosmétiques, elles dépendent également de la réglementation européenne évoquée précédemment [41]. Les huiles essentielles tout comme les mélanges de plantes sont parfois à la frontière entre médicament et cosmétique, et, selon leur utilisation et leur revendication, elles peuvent parfois être considérées comme médicament, et dépendre de l'ANSM.

I.3. Techniques d'obtention d'extraits, d'huiles essentielles et de résinoïdes

I.3.A *Hydro-distillation et entraînement à la vapeur d'eau*

L'hydro-distillation repose sur la capacité de la vapeur d'eau à entraîner les composés volatils, formant l'huile essentielle : on parle de distillation azéotropique. Le principe est le suivant : la matière à distiller est mise en contact avec l'eau dans un récipient (ou dans un récipient contenant un compartiment perforé au-dessus de l'eau pour l'entraînement à la vapeur) et l'eau de ce récipient est portée à ébullition. L'eau chaude détruit les parois cellulaires de la matière végétale qui libère alors ses constituants, et la vapeur d'eau chargée en composés volatils se déplace dans le col de cygne jusqu'au réfrigérant, où elle se condensera par refroidissement et formera l'huile essentielle qui sera séparée de l'eau. Le fait de chauffer la matière première peut parfois entraîner la dégradation de composés thermosensibles. Un schéma de la distillation est représenté ci-contre.

Fréquemment, les eaux de distillation contenant une fraction plus hydrophile que l'huile essentielle, sont récupérées et utilisées telles quelles, comme c'est le cas pour la rose, le bleuet ou encore l'aubépine.

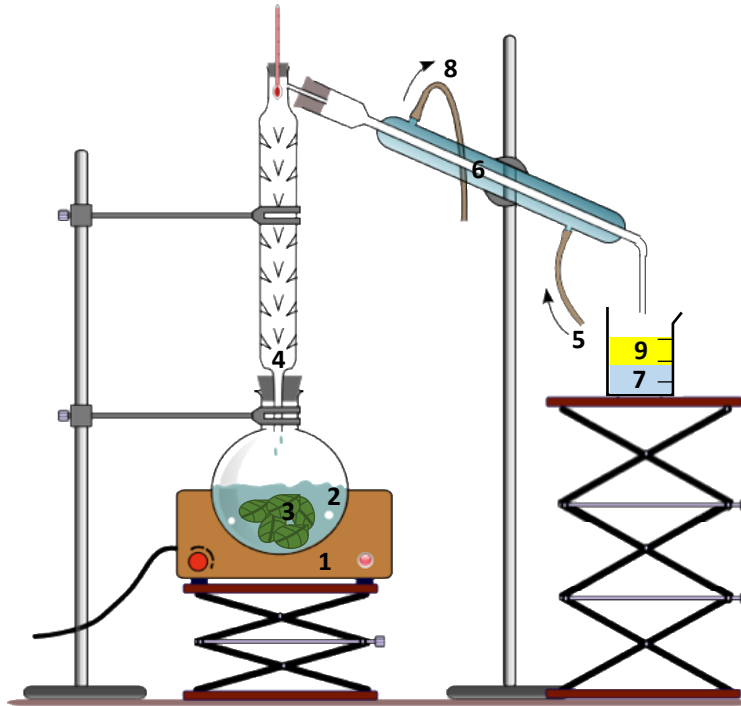


Figure 2 : Schéma de principe de la distillation.

1 : chauffage, 2 : eau, 3 : matière végétale, 4 : colonne de distillation, 5 : entrée d'eau froide, 6 : réfrigérant, 7 : eau de distillation, 8 : sortie d'eau, 9 : huile essentielle.

Par ailleurs, l'expression à froid est également un moyen d'obtenir une huile essentielle, mais est réservée aux hespéridés. Dans le péricarpe des agrumes, des petites glandes assurent la production de ces composés volatils, odorants. Ils ont longtemps été extraits à main nue, à l'aide de gants et de pierre ponce pour racler l'écorce, et récupérer l'huile essentielle avec une éponge, mais aujourd'hui, le système est mécanisé [23,41].

I.3.B *Extraction solide-liquide*

La macération consiste à mettre la matière première végétale dans une cuve, où sera ensuite versé le solvant. A échelle industrielle, ces cuves peuvent contenir jusqu'à 3000 litres de fluide. Les plantes ou fleurs sont déposées sur des étagères dans la cuve, et ne sont donc pas entassées, ce qui permet une macération homogène des plantes.

La macération peut être faite avec différents solvants (alcools, hydrocarbures) seuls ou en mélange. L'extrait obtenu sera différent dans sa composition et son appellation en fonction de la nature du solvant employé. Par exemple, un extrait obtenu par macération alcoolique est appelé extrait alcoolique. De même, des extraits hydro-alcooliques, des extraits au polyéthylène glycol (souvent utilisés en cosmétique) ou encore des extraits aqueux sont réalisés communément [23].

A contrario, si la matière première végétale est extraite à l'aide d'hydrocarbures, après évaporation du solvant, on obtient une concrète. Si la matière première végétale est sèche, on obtient un résinoïde [43,44]. Ces extraits, très odorants, sont souvent lavés à l'éthanol (ou autre alcool) pour être débarrassés des cires et autres contaminants qui précipitent : on obtient alors une absolue après évaporation de l'alcool.

Les temps d'extraction varient en fonction de la nature de la matière végétale à extraire, ainsi que du solvant utilisé. L'agitation, la température lors de l'extraction, ainsi que le changement et renouvellement de solvant, sont des paramètres qui permettent d'optimiser l'extraction et d'enrichir le macérat en composés extraits.

D'autres techniques qui peuvent être utilisées classiquement sont les techniques d'extraction par percolation, au Soxhlet, par infusion, ou par décoction.

I.3.B.a Techniques d'extraction vertes et éco-extraction

Malgré leur simplicité, leur faible coût et leur efficacité, les méthodes d'extraction classiques posent certains problèmes environnementaux qui ont stimulé le développement de techniques plus écologiques. Aujourd'hui, les méthodes d'éco-extraction sont en plein essor et se développent chez les industriels dans le but d'utiliser une "chimie verte" ou "chimie renouvelable" plus durable en réduisant les déchets, en supprimant la menace de toxicité environnementale des solvants, co-produits ou déchets, en valorisant les co-produits ou le résidu de distillation et en minimisant la consommation d'eau et d'énergie afin de répondre aux problématiques environnementales actuelles. Parmi les techniques d'éco-extraction utilisées actuellement, on peut citer l'extraction par fluide supercritique, les techniques d'extraction aux ultra-sons, aux solvants eutectiques, à l'eau sub-critique, et aux micro-ondes [45,46].

II. LES PLANTES A EXSUDATS

Les gommés, résines et latex sont des exsudats composés de substances organiques sécrétées par les plantes lorsque leurs tissus sont endommagés. Ces exsudats leur servent à se protéger de l'extérieur, et notamment à prévenir les invasions par les insectes et bactéries. Ils sont utilisés dans de nombreux secteurs tels que la cosmétique, l'alimentation, la phytothérapie ainsi que les produits pharmaceutiques. Certains de ces exsudats sont présents sur le marché depuis des millénaires, comme la myrrhe et l'encens mentionnés précédemment [47].

II.1. Types d'exsudats végétaux

De nombreuses plantes sécrètent des substances lorsqu'elles subissent un traumatisme, une agression ou une infection (infection de pathogènes, agresseurs herbivores, blessure mécanique). Par exemple, la plupart des conifères sécrètent abondamment de la résine, comme la colophane du pin maritime, autrefois exploitée pour le calfatage de navires. Nous nous focaliserons ici sur les plantes à huiles essentielles, résines et oléo-gomme résines, ainsi que sur les plantes à gommés. Les plantes lactifères telles que les euphorbiacées ou tout autre plante pouvant sécréter des mucilages ou encore des cires ne seront pas traités.

II.1.A *Plantes à huiles essentielles*

Des résines huileuses ou huiles essentielles sont également accumulés dans les poils glanduleux sécréteurs de certaines plantes aromatiques (*Lamiaceae*, *Rubiaceae*), ou encore dans des poils intracarpellaires chez de nombreux hespéridés, et produisent eux aussi un exsudat riche en terpénoïdes et/ou phénylpropanoïdes [48]. L'huile essentielle peut être localisée dans les fleurs, comme c'est le cas pour la rose, la lavande, le jasmin ou l'ylang, elle peut également être trouvée dans les feuilles, par

exemple, chez la citronnelle, la menthe, le patchouli, ainsi que dans l'écorce pour certaines épices telles que la cannelle, ou même dans les racines comme pour le vétiver par exemple.

II.1.B *Plantes à résines naturelles*

Les oléorésines sont des matériaux semi-solides ou solides, constitués par un mélange de composés issus du métabolisme secondaire de la plante comprenant des composés volatils et non-volatils, de nature organique terpénique et/ou phénolique, insolubles dans l'eau mais solubles dans certains solvants organiques. Ces résines sont sécrétées dans des structures spécialisées localisées dans la plante ou à sa surface, et ont un rôle dans les interactions écologiques [47,49]. Dans des conditions normales, la résine est accumulée dans ces organes spécialisés et contribue à la protection physiologique de la plante (régulation de la température, lutte contre la dessiccation et les rayonnements UV), alors que lors d'une agression biotique ou mécanique, l'exsudat est sécrété pour protéger la plante.

Plusieurs milliers d'espèces sont en mesure de produire ces exsudats, qui peuvent être produits dans n'importe quel tissu ou organe de plante [47]. À ce jour, les résines sont classées dans différentes catégories en fonction de leur nature, qu'elles soient des résines huileuses, des baumes (*Burseraceae*), ou encore des copals, et peuvent être à dominante phénolique et/ou terpénique. Un exemple de plantes produisant des résines phénoliques sont les arbrisseaux du genre *Styrax*. Les résines dures de copal, Damar ou le mastic, proviennent des genres *Agathis* (*Araucariaceae*) et *Bursera* (*Burseraceae*) pour le copal, des *Pistacia* (*Anacardiaceae*) et d'espèces de *Dipterocarpaceae*, pour le damar et mastic, respectivement. Ce sont des résines qui contiennent des terpénoïdes mais aussi des lignanes (dérivés polyphénoliques) dans leur partie non volatile [50].

Suite à un traumatisme, les résines des espèces *Boswellia*, *Canarium* ou *Commiphora* sont exsudées hors de la plante et forment alors en séchant une barrière protectrice de résine, composée principalement de terpénoïdes aux propriétés antimicrobiennes et répulsives envers leurs agresseurs. Elles peuvent aussi être excrétées hors des cellules végétales suite à leur synthèse dans des canaux résinifères et servir ainsi à combler les fissures dans leur bois.

Depuis les progrès de la chimie analytique et des instrumentations utilisées pour observer l'anatomie des plantes, et maintenant que la composition des résines et huiles peut être vérifiée, ces dernières ne doivent plus être confondues avec d'autres types d'exsudats.

II.1.C *Plantes à gommés*

Contrairement aux résines, constituées de terpénoïdes, phénols et dérivés phénoliques, les gommés végétales sont solides et constituées d'un mélange de polysaccharides (carbohydrates), et de particules minérales, qui sont soit solubles dans l'eau, ou qui se gorgent d'eau et forment alors un « gel ». Ces gommés sont insolubles dans les solvants organiques, les huiles, et l'alcool. Leur hydrolyse permet la libération de sucres simples comme l'arabinose, le galactose ou encore le mannose [51]. Certaines gommés sont exsudées suite à des blessures, en même temps que la résine, de la tige et du tronc de l'arbre, et dans une moindre mesure, exsudée des racines [47]. Les gommés sont des matières premières à la fois élastiques et collantes, qui peuvent jouer un rôle de colle naturelle [49] et sont généralement non-odorantes, à l'inverse des résines et oléorésines. Elles sont aussi triées selon leur qualité et leur forme [52].

Les gommages n'ont pas la même composition que les résines, et n'ont donc pas non plus la même origine biosynthétique. En effet, les gommages résultent de la métamorphose des celluloses de la paroi cellulaire végétale, en une substance amorphe non-organisée. C'est suite à la désintégration de la paroi cellulaire que les polysaccharides s'accumulent, et forment la gomme. La gomme peut être produite dans les tissus de l'écorce (par exemple la gomme arabique chez les *Acacia spp.*) ou encore entre les lamelles de la paroi cellulaire [49]. Les gommages sont produites par différentes espèces, moins nombreuses que les espèces productrices de résines, et dont une des plus connues est la gomme arabique, qui provient des légumineuses du genre *Acacia* [47]. Elles sont surtout utilisées de nos jours comme agents épaississants, émulsifiants et stabilisants dans l'industrie agro-alimentaire [52]. Les gommages peuvent, en étant exsudées, se mélanger avec les cires sur la surface des feuilles ou contenir des tannins provenant de la paroi de l'écorce, ce qui peut expliquer la formation des gommages-résines.

II.1.D *Plantes à gommages-résines*

Certaines plantes peuvent produire à la fois de la résine et de la gomme (oléogommages-résines). Cela est possible car durant le développement des canaux sécréteurs de résine, situés dans le parenchyme cortical (écorce) de l'arbre (canaux axiaux et radiaux vus entre l'épiderme et le cambium vasculaire chez *Boswellia spp.*) [53], chez certaines espèces de plantes, la paroi cellulaire entourant ces canaux est rompue, laissant alors les carbohydrates s'incorporer dans la résine. Parfois même, la synthèse de la gomme se produit après agression ou blessure, dans les cellules qui ont été cassées lors de traumatismes, et où est déjà synthétisée la résine. Beaucoup de conifères (tels qu'*Araucaria spp.* et *Picea spp.*) produisent des oléogommages résines, ainsi que des espèces d'angiospermes telles que les mangues (*Mangifera spp.*), la myrrhe (*Commiphora spp.*) ou l'encens (*Boswellia spp.*).

La myrrhe et l'encens ont donc une partie « oléo » ou huile essentielle, composée de composés volatils (monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes, diterpénoïdes), une partie « résine » avec notamment des triterpènes, et une partie « gomme » constituée de polysaccharides.

Les résines sont utilisées pour leurs propriétés olfactives, ainsi que pour leurs propriétés médicinales et biologiques (fongicides, anti-microbiennes, etc.). Elles sont aussi utilisées, pour les grades de moins bonne qualité, en tant que substances adhésives, savons, vernis, pigments et d'autres formes. Quant aux gommages, elles peuvent être valorisées une fois séparées des résines pour leurs propriétés gélifiantes et collantes, en tant qu'excipients dans des préparations cosmétiques et alimentaires (gels, crèmes, dentifrices) ou encore dans des produits pharmaceutiques (hydrogel, capsules), dans l'industrie alimentaire (pain, jus de fruits, gâteaux) et même pour la purification de l'eau [54]. La gomme arabique est par exemple, utilisée pour ses propriétés colloïdales dans l'industrie, ou encore intégrée dans la nourriture (sirops, sorbets) [51].

II.2. Défense des végétaux face à leur environnement biotique

Les végétaux ont la capacité de réagir face à des changements biotiques ou abiotiques dans leur environnement, lorsque leur physiologie normale en est affectée. Pour cela, des mécanismes de défense (ou attraction) de la plante se mettent en place par différents systèmes : hormonaux, production de composés allélopathiques, métabolites secondaires, etc. La protection des plantes face à leur environnement peut être intrinsèque (défenses morpho-anatomiques et défenses chimiques constitutives), ou induite (défenses chimiques induites). En réponse à un agresseur, les plantes peuvent produire des défenses chimiques dites constitutives : par la production de métabolites primaires tels que

des acides aminés, glucides, lipides, protéines ou par la production de métabolites secondaires, non vitaux pour la plupart, comme des molécules azotées, des composés phénoliques et des terpénoïdes. Les molécules produites peuvent être toxiques (alcaloïdes, glucosinolates, tanins) pour empoisonner l'agresseur en affectant son système nerveux, ses voies respiratoires ou digestives. Par exemple, le latex de la chicorée contient des lactones sesquiterpéniques qui repoussent les herbivores. De même, les résines de certaines plantes telles que les conifères, à forte teneur en α -pinène, inhibent les micro symbioses dans l'appareil digestif des agresseurs, inhibent la croissance mycélienne [55–57]. De même, des espèces d'encens et de myrrhe telles que *B. serrata*, *B. papyrifera* et *C. africana* ont montré des propriétés affectant la physiologie des punaises et le développement des chrysalides d'insectes [58,59]. Par ailleurs, ces défenses chimiques constitutives peuvent également avoir un rôle de protection mécanique. En effet, les exsudats de myrrhe, de ciste ladanifère ou encore d'encens sont riches en métabolites secondaires qui rendent ces exsudats visqueux et collants, constituant une barrière mécanique imperméable aux insectes, qui y restent piégés.

Les défenses chimiques sont dites « induites », lorsqu'elles apparaissent après une attaque par un herbivore. Par exemple, lorsqu'une plante a été agressée par un herbivore, elle va, en plus de produire davantage de composés toxiques (alcaloïdes, tanins...), libérer des gaz comme l'éthylène afin de prévenir les autres plantes des agresseurs. De même, lors de leur agression certaines plantes vont émettre des signaux hormonaux qui vont permettre d'attirer les prédateurs de ces agresseurs (défense indirecte). Par exemple, après une attaque de *A. thaliana* par des larves de Piéride du chou, il a été mis en évidence l'émission de substances terpéniques volatiles par la plante, qui attirent des parasitoïdes de la chenille [55]. Il a même été observé la production induite des résines chez *C. confusa* et *B. neglecta*, lors d'une agression par des larves des espèces de *Sphenoptera* [60]. Un autre exemple de défenses chimiques induites suite à l'agression d'une plante par un ravageur est celui du oud, un bois produit par les espèces *Aquilaria*. Lorsqu'il est soumis à des conditions de stress suite à son infection par un champignon, le oud libère du jasmonate de méthyle qui induit l'accumulation de sesquiterpénoïdes dans son bois, produisant alors une oléorésine très odorante [61,62].

Parfois, les défenses chimiques induites telles que les résines et huiles essentielles sont accompagnées de la production de gommes. Le but premier des gommes est nutritif : la gomme sert à permettre le bon développement d'une graine (gomme à graine) en lui fournissant des éléments nutritifs tels que des sucres, qui peuvent être utilisés pour son propre métabolisme en cas d'agression. La gomme a donc plusieurs rôles, et constitue une protection indirecte de la graine et/ou de la future plante.

II.3. Composition chimique et techniques d'analyse des résines et huiles essentielles

II.3.A Biosynthèse de métabolites secondaires d'origine végétale

Les principaux métabolites secondaires de plantes étudiés dans cette thèse sont des terpénoïdes, des phénols et leurs dérivés. Ils ont pour précurseurs certains carbohydrates générés lors de la photosynthèse de la plante (métabolisme primaire), et sont métabolisés en produits dérivés du pyruvate. Les terpénoïdes et composés phénoliques, observés dans les huiles essentielles, sont synthétisés par diverses voies métaboliques qui seront présentées. Cependant, les alcaloïdes, les flavonoïdes et les produits dérivant de la voie de l'acétate ne seront pas abordés.

II.3.A.a Terpénoïdes

Les terpénoïdes sont présents chez tous les êtres vivants mais la plus grande diversité est vue chez les plantes. Aujourd'hui, les structures de près de 30 000 terpénoïdes ont été élucidées grâce à des analyses de plus en plus performantes. La quantité de métabolites secondaires varie au cours du temps car ils sont dégradés et régénérés fréquemment en fonction des besoins de la plante. Leur dégradation peut servir à nouveau pour la production de métabolites primaires, ou pour leur relargage dans l'environnement.

Les terpénoïdes ont une structure de base à 5 carbones (l'unité isoprénique). En fonction du nombre d'unités isoprène associées, ils peuvent être classés dans différentes catégories : monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes, diterpénoïdes, triterpénoïdes, etc. Ces unités isopréniques proviennent de l'isopentenyl diphosphate (IPP) et de son isomère le diméthylallyl diphosphate (DMAPP), par deux voies métaboliques distinctes : la plus classique étant la voie du mévalonate (aussi appelée voie de l'acide mévalonique). Cette voie métabolique commence par l'association de trois molécules d'acétylcoenzyme A (Acétyl-coA), qui sont ensuite pyrophosphorylées, décarboxylées et déshydratées pour former l'IPP, isomérisé en DMAPP. La deuxième voie métabolique permettant également la production de l'IPP est la voie métabolique du méthylérythritol phosphate qui, à partir de l'association d'une molécule de 3-phosphoglycérate (3-PGA) et de deux atomes de carbones dérivés du pyruvate, conduirait à la synthèse d'un intermédiaire méthylérythritol phosphate (MEP) qui serait ensuite converti en IPP [49,62]. Ensuite, une molécule d'IPP peut s'associer au DMAPP afin de former le géranyl pyrophosphate (GPP). L'IPP peut également s'ajouter au GPP et donne ainsi le farnésyl pyrophosphate (FPP), et ainsi de suite. Suite à cela, surviennent des transformations enzymatiques basées sur la réaction des carbocations issus du départ du groupement pyrophosphate, souvent suivies de fonctionnalisation par oxydation. Le GPP permet alors la production de monoterpènes et monoterpénoïdes tandis que le FPP est à la base de la synthèse des sesquiterpén(oïd)es [63]. Cette voie biosynthétique est représentée par la figure ci-dessous.

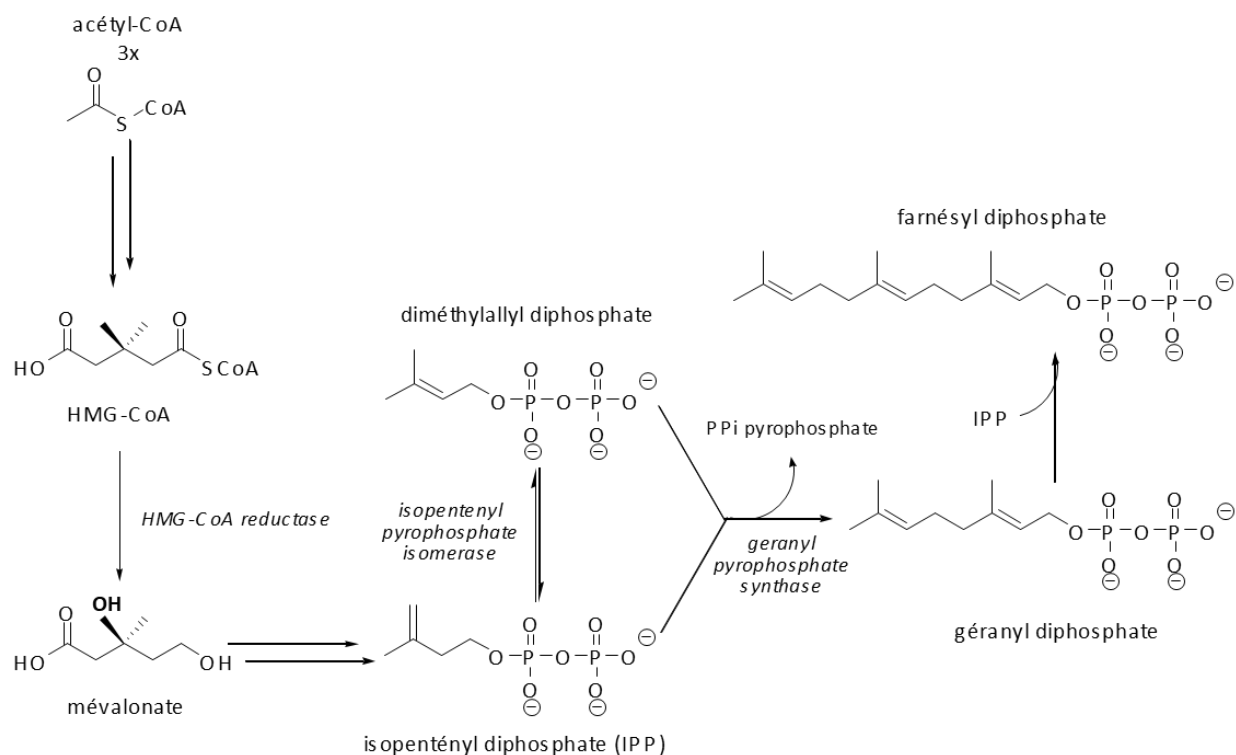


Figure 3 : Schéma de la voie biosynthétique des isoprénoïdes.

La biosynthèse des terpénoïdes via la voie du mévalonate se déroule généralement dans le réticulum endoplasmique du cytosol, et entraîne principalement la production de sesquiterpènes, tandis que la voie MEP aboutissant à la production de monoterpènes et diterpènes se déroule plutôt dans les plastes des cellules végétales [49,62].

La fraction volatile de la résine est majoritairement constituée de mono- et sesquiterpénoïdes, alors que les fractions semi-volatiles et non-volatiles renferment des diterpénoïdes et triterpénoïdes, respectivement, avec des fonctions aldéhydes, alcools, acides ou encore esters. La composition de la résine ou de l'huile essentielle peut varier en fonction de l'espèce de plante, de son cycle végétatif, du chémotype étudié, de sa culture ou d'autres facteurs.

Par ailleurs, certaines espèces peuvent produire majoritairement une classe de composés tels que des mono-, des sesqui- ou des di-terpénoïdes, alors que d'autres produisent toutes ces classes, mais peuvent générer des produits avec des squelettes spécifiques et/ou quasi exclusifs d'une espèce. Par exemple, les conifères ont des résines très riches en composés volatils tels que les monoterpénoïdes, alors que les espèces de *Commiphora* telles que *C. myrrha* ont davantage de sesquiterpénoïdes. Certains composés peuvent aussi être considérés comme des marqueurs d'une famille ou d'une espèce de plantes, ou inversement être présents dans plusieurs familles. C'est par exemple le cas des composés de type labdane trouvés chez les *Cupressaceae* mais aussi chez les *Cistaceae*.

II.3.A.b Composés monophénoliques et autres composés

Les composés phénoliques sont largement présents dans le règne végétal, et sont caractérisés par leur noyau aromatique substitué par au moins une fonction alcool [64]. Contrairement aux terpénoïdes formés par l'association d'unités isoprène, les composés phénoliques dérivent des phénylpropanoïdes. Ils peuvent être synthétisés à partir de deux voies de biosynthèse : les voies de l'acide malonique et de l'acide shikimique [65,66].

La voie du shikimate parvient à produire l'acide aminé phénylalanine à partir de produits du métabolisme des sucres, qui peut servir pour la production d'alcaloïdes, de protéines, ou permettre la synthèse du phénylpropanoïde acide cinnamique, à l'origine de la synthèse des acides phénoliques, polyphénols et des phénylpropanoïdes. Ces acides phénoliques sont composés d'un cycle à 6 carbones lié à un ou trois autres carbones [67,68]. La voie du shikimate est représentée ci-dessous.

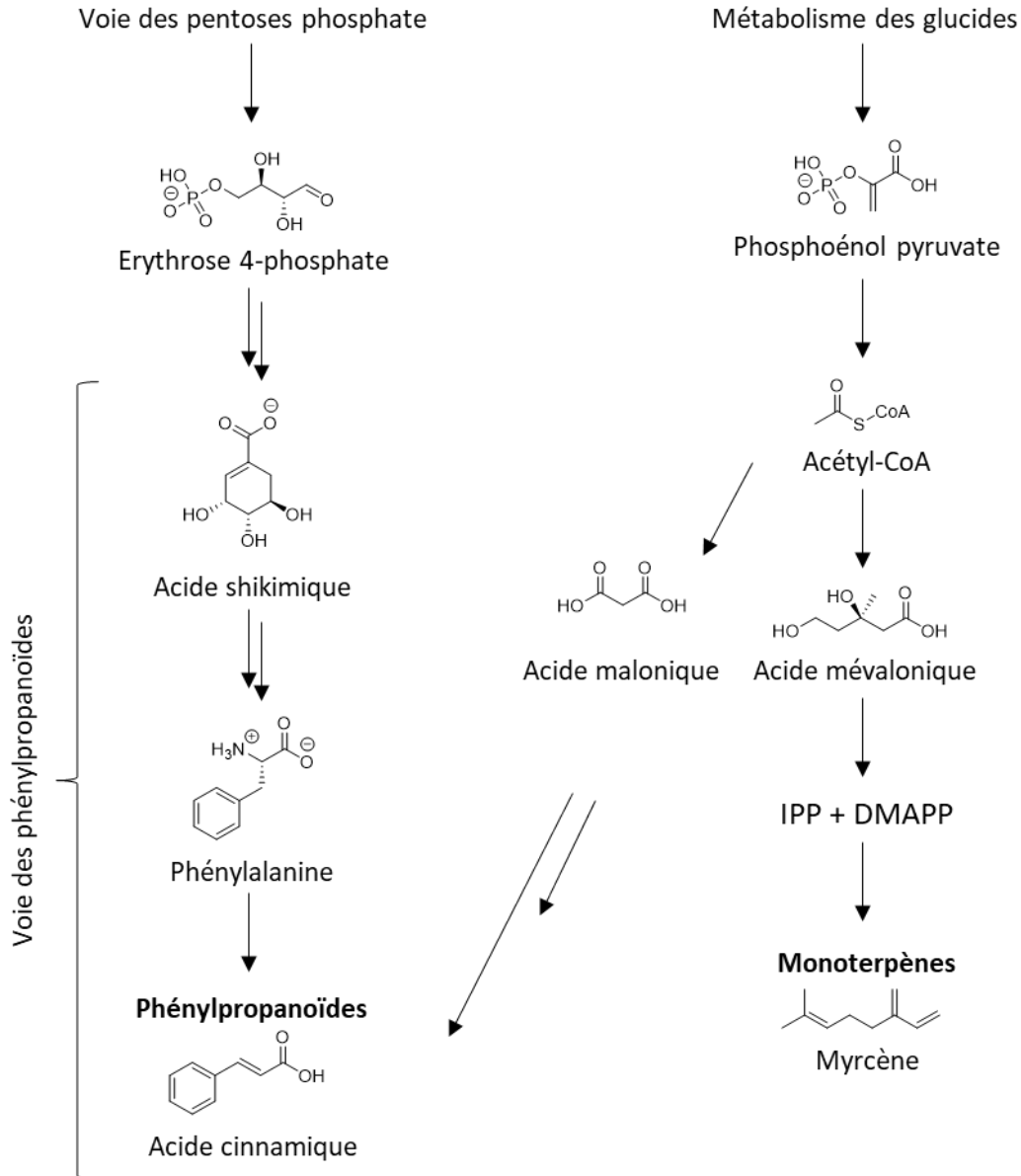


Figure 4 : Schéma de la voie biosynthétique des phénylpropanoïdes.

Parmi ces composés phénoliques, l'acide salicylique est par exemple utilisé pour ses propriétés analgésiques et anti-coagulantes, la vanilline pour son arôme et son parfum, ou encore l'acide gallique pour ses propriétés anti-oxydantes. Ils sont issus respectivement, du saule ou de la reine des prés, de la vanille et du châtaigner. Par ailleurs, les polyphénols et leurs dérivés (tels que les flavonoïdes), ont également des propriétés biologiques. Par exemple, les polyphénols sont connus pour leurs activités anti-radicalaires et anti-oxydantes, par le transfert d'un proton aux espèces radicalaires, par exemple [69]. Les polyphénols peuvent ainsi prévenir des maladies cardiovasculaires [70], des cancers, et ont des propriétés neuro-protectives et anti-inflammatoires [71–73]. Les alcaloïdes peuvent également être présents dans les résines, et ont de fortes propriétés bioactives, mais aussi une forte toxicité, et sont ainsi utilisées dans diverses préparations pharmaceutiques. Par exemple, des médicaments anti-dépressifs, anti-cancéreux ou anesthésiant ont été développés grâce aux alcaloïdes [74].

II.3.B *Activités olfactives, biologiques et enzymatiques de métabolites secondaires*

Tous ces composés, issus du métabolisme secondaire de la plante, peuvent présenter divers effets biologiques. Afin de mettre en évidence ces propriétés, plusieurs types de tests, peuvent être mis en place et appliqués à la matière première, à des extraits voire même à des composés uniques si nécessaire. Des tests enzymatiques peuvent être effectués, afin de voir si le mécanisme enzymatique se produisant chez le patient à traiter peut être modulé (inhibition ou activation) par un extrait végétal. Des tests biologiques permettent d'observer directement l'action des extraits dont on suspecte une activité sur des cellules vivantes.

II.3.B.a Activités enzymatiques et chimiques

Les tests discutés ici sont des tests enzymatiques et chimiques, qui ne nécessitent pas de matrice biologique pour être mise en place. Dans cette thèse, l'attention a été portée aux activités cosmétiques (test anti-élastase, anti-tyrosinase), anti-inflammatoires (anti-lipoxygénase) et anti-oxydante.

Activité anti-oxydante

La peroxydation des lipides est un mécanisme d'oxydation qui endommage les lipides et donc les cellules, et qui est connu pour être responsable de plusieurs maladies. Par exemple, la peroxydation lipidique pourrait induire des adduits de protéines dans le cerveau de patients souffrant de maladies neurodégénératives. De plus, le stress oxydatif est un autre mécanisme qui perturbe la fonction physiologique normale du corps humain en produisant un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et même des espèces peroxy-nitrites qui pourraient être toxiques pour les organismes vivants. Les ROS sont connus pour accélérer le processus de vieillissement et jouer un rôle dans la pathogenèse de plusieurs maladies chroniques, telles que l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, les troubles de l'immunité et les cancers. Le stress oxydatif est un processus endogène normal qui se produit dans notre corps et qui est contrôlé par des enzymes redox et des antioxydants endogènes. Cependant, un équilibre fragile entre la production de ROS et les systèmes capables de moduler le taux de ROS dans nos cellules doit être maintenu pour maintenir une fonction physiologique normale [75,76].

Les antioxydants sont capables de prévenir ces troubles en régulant la teneur en radicaux libres dans nos cellules. Les antioxydants peuvent agir en inhibant la chélation des métaux, en neutralisant l'oxygène singulet 1O_2 qui a un pouvoir oxydant très puissant, ou encore en inactivant les radicaux libres [58]. Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un test permettant de mesurer le potentiel anti-oxydant d'une espèce, et le principe est le suivant : les composés antioxydants présents dans l'extrait végétal piègent les ROS du milieu. Le test est donc basé sur la capacité d'un anti-oxydant à réduire le radical chimique stable DPPH $^{\bullet}$ par transfert d'hydrogène entre le composé antioxydant supposé et le radical. Le DPPH $^{\bullet}$, initialement violet, se transforme en DPPH-H jaune pâle. La diminution de la couleur violette montre ainsi le pouvoir anti-oxydant de l'extrait, de ce fait, la capacité anti-oxydante de l'échantillon peut être suivie au spectrophotomètre [77]. La réaction chimique à la base de ce test est illustrée ce-dessous.

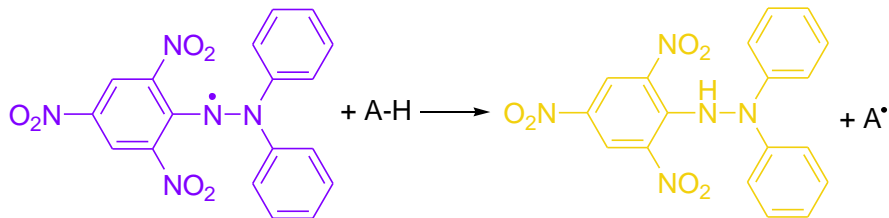


Figure 5 : Réaction chimique permettant le transfert d'hydrogène de l'anti-oxydant (A-H) au DPPH, en violet.

Il est bien connu que de nombreux fruits rouges ont de fortes propriétés anti-oxydantes, c'est notamment le cas de la grenade, ou encore de la vigne avec ses nombreux tannins et stilbènes. Ce fort potentiel anti-oxydant, comme vu précédemment, est généralement attribué aux composés phénoliques présents dans les végétaux [78].

Activités cosmétiques : test anti-tyrosinase et test anti-élastase

Les mélanocytes sont des cellules spécialisées capables de produire le pigment mélanine au cours de la mélanogénèse. La mélanine est synthétisée par l'enzyme tyrosinase, à partir de l'acide aminé L-tyrosine, et donne sa couleur aux cheveux et à la peau. Les troubles de l'hypo-pigmentation ou l'apparition de mélanomes sont la conséquence de la perturbation de diverses parties de la voie de synthèse de la mélanine. C'est la tyrosinase qui joue un rôle clé dans la régulation de la synthèse de la mélanine au cours de la mélanogénèse et permet de contrôler la pigmentation de la peau et donc, son éclaircissement. Pour prévenir les mélanomes et contrôler la couleur de la peau, l'activité de l'enzyme peut être modulée [79,80]. Cette enzyme catalyse l'hydroxylation de la L-tyrosine et la convertit en L-DOPA, qui est ensuite oxydée en dopaquinone, nécessaire à la synthèse de la mélanine.

L'activité anti-tyrosinase (ou anti-mélanome), peut donc être suivie par spectrophotométrie, en mesurant l'absorption du chromophore dopaquinone (de couleur marron/rouge). Ainsi, plus il y aura de composés aux effets anti-mélanome dans l'extrait végétal en contact avec l'enzyme, moins il y aura de dopaquinone produite. Cela permettra ainsi de surveiller l'activité de la tyrosinase et obtenir des informations sur la fonction normale ou anormale de cette enzyme [81].

Le processus de vieillissement de la peau est une conséquence de la sénescence cellulaire, qui peut être accélérée par plusieurs facteurs tels que l'exposition de la peau aux rayons UV, le métabolisme endocrinien ou des facteurs génétiques. Les fibroblastes sont les cellules responsables de la production d'élastine dans notre organisme, principalement pendant la période de croissance. Comme le collagène, l'élastine est une protéine fibreuse qui joue un rôle structurel dans le maintien de l'élasticité de la peau et de son aspect rebondi. Plus la peau vieillit, plus ses niveaux de collagène et d'élastine diminuent. L'enzyme élastase est capable de digérer l'élastine, ce qui entraîne une réduction de la fermeté et de l'élasticité de la peau. Pour ralentir ce processus, il faut des composés capables d'inhiber l'activité de l'élastase [82].

Lorsque la chaîne peptidique d'une protéine est clivée par l'élastase, il en résulte un changement de couleur dû au produit de clivage obtenu. Ainsi, par spectrophotométrie, on va pouvoir observer la protection du peptide par les composés inhibiteurs de l'élastase présents dans l'extrait végétal, lorsque l'enzyme a pu être inhibée par ceux-ci.

Par exemple, une activité inhibitrice de l'élastase par des plantes riches en tannins telles que *Lythri herba*, ou encore des plantes telles que le thé blanc (*Camellia sinensis*) ou le gaillet gratteron (*Galium aparine* L.), ont été observées [83,84]. Pour une activité anti-mélanome, des stilbenes et des composés phénoliques ont montré des propriétés inhibitrices de la tyrosinase, avec notamment le résorcinol par exemple, ou encore l'oxyresvératrol du mûrier blanc (*Morus alba* L.) [81,85,86].

Activité anti-inflammatoire

Le processus inflammatoire débute à la suite d'une blessure, d'un dommage physique ou d'un stress oxydatif. Il peut être de courte durée (inflammation aigüe), ou persister dans le temps (inflammation chronique), et porte préjudice au bon fonctionnement de notre organisme. L'une des principales raisons de la dérégulation de la réponse inflammatoire est liée à une activation incontrôlée des macrophages. Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée, impliquées dans l'établissement et la régulation de la réponse inflammatoire. Ces cellules peuvent reconnaître une large gamme structurale de molécules étrangères, par exemple, les lipopolysaccharides des bactéries (LPS), et déclencher alors l'inflammation. Suite à cela, un stimulus pro-inflammatoire est apporté par des cytokines, des histamines ou d'autres médiateurs pro-inflammatoires qui avertissent du dommage causé. Ensuite, les voies de signalisation inflammatoires incluant des cascades de phosphorylation aboutissant à l'activation des lipoxygénases (LOX) ou encore du Tumor Necrosis factor alpha (TNF-alpha), vont être stimulées. L'activation de la LOX et du TNF-alpha vont aboutir à la synthèse de leucotriènes, et à l'activation du Facteur Nucléaire- κ B (NF- κ B), respectivement. Ces médiateurs promeuvent l'établissement de l'inflammation sur le site lésé, et finissent par déclencher la production de molécules anti-inflammatoires pour combattre l'inflammation. Par exemple, le NF- κ B va permettre d'activer la production d'oxyde nitrique (NO) ou de ROS qui combattent l'inflammation dans des conditions physiologiques normales. Or, dans des conditions anormales dues à une surproduction de NO, de ROS ou à une surexpression de la LOX, cela va engendrer un stress oxydatif et une toxicité du NO et des ROS, et cela aboutira à une inflammation encore plus forte, voire à des maladies inflammatoires [87].

L'enzyme lipoxygénase, responsable de la synthèse des leucotriènes, est capable d'oxyder les acides gras polyinsaturés par dioxygénation et de les convertir en hydroperoxydes ou en lipides correspondants, tels que les eicosanoïdes, précurseurs des leucotriènes. Ainsi, en modulant l'activité de la LOX, on va pouvoir contrôler l'inflammation, par exemple en inhibant la médiation lors des différentes étapes de l'inflammation. Certains inhibiteurs de la LOX sont déjà connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires, comme certains flavonoïdes ou encore l'acide rosmarinique [88]. Dans ce test, l'acide linoléique est transformé en son chromophore hydroperoxyde diénique correspondant, suite à l'action de la lipoxygénase. De ce fait, la diminution de la production de ce chromophore (enzyme inhibée), peut être suivie et quantifiée par spectrophotométrie, et prouve ainsi le potentiel anti-inflammatoire des composés présents dans l'extrait végétal.

Des tests biologiques peuvent également être mis en place sur des lignées cellulaires cancéreuses pour confirmer les activités enzymatiques observées, comme par exemple avec le test au sel de tétrazolium (MTT) qui va permettre le suivi de la viabilité des cellules cancéreuses suite à leur incubation avec un composé ou un extrait testé [89]. De plus, un test au réactif de Griess sur des cellules de l'inflammation permet également de mesurer la capacité de l'extrait végétal à diminuer la production de monoxyde d'azote produit par les cellules, et ainsi montrer la capacité de l'extrait à réduire l'inflammation [90]. Par ailleurs, la mesure du stress oxydatif et des ROS, par une sonde 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-

DA), rend compte des potentiels anti-oxydants des extraits végétaux testés car les ROS de l'échantillon vont oxyder l'oxyde en un composé fluorescent [91]. Dans ces tests, les activités peuvent être mesurées par spectrophotométrie. Des tests ultérieurs *in vivo* sur animaux tels que le rat, le poisson-zèbre ou la plante *A. thaliana* pourront également être effectués afin d'étudier si le produit (extrait, composé, préparation végétale, etc.) peut être efficace *in vivo*.

II.3.B.b Activité olfactive

Nous sommes capables de capter les odeurs qui nous entourent par le biais de notre système olfactif principal. En effet, lorsque nous sommes en contact avec des molécules odorantes, elles sont captées par les cils de l'épithélium supérieur de nos narines. Chaque molécule odorante peut se fixer sur un neurorécepteur olfactif protéique, qui va alors déclencher un influx nerveux et va être transmis au bulbe olfactif via les nerfs olfactifs [92]. L'information sensorielle est ensuite envoyée au système nerveux central, par le biais du tractus olfactif latéral. Il existe une forte association entre les odeurs perçues et la mémoire et l'émotion. Le système trigéminal quant à lui, permet de percevoir des sensations somesthésiques telles que les sensations de froid, de piquant, d'âcre. La plupart des odorants stimulent le système olfactif tout comme le système trigéminal, ces deux systèmes étant intimement liés [93]. Le système trigéminal permet la potentialisation des sens, en permettant notamment le lien entre le goût, l'odorat et la vision. Ainsi, une alerte imagée pourrait être traduite par notre cerveau suite à la perception de l'odeur de brûlé, par exemple.

Nous utilisons une famille génique d'environ 400 récepteurs différents pour détecter les odeurs qui nous entourent [94], et nous pouvons distinguer jusqu'à 10 000 composés odorants, pour les plus entraînés d'entre nous. De par la variabilité génétique, nous partageons seulement 250 de ces récepteurs environ. L'intégration de l'information olfactive est complexe, car un odorant peut activer plusieurs récepteurs et ces récepteurs ne sont pas spécifiques à un seul odorant (processus olfactif combinatoire). En effet, chaque substance odorante active un ensemble spécifique de récepteurs olfactifs et, par conséquent, génère une empreinte unique (un code olfactif), qui sera alors déchiffré par le cerveau pour faire correspondre notre représentation de cette odeur (odeur de rose, par exemple) [95]. Les différences d'expression de ces récepteurs peut expliquer les variations de réponses observées au sein d'un panel.

Certaines personnes sans odorat, dites anosmiques (ca. 5% de la population) ou avec peu/ plus d'odorat (hyposmiques, 15 % de la population) peuvent avoir une dysfonction ou une absence de récepteurs olfactifs, de bulbe olfactif ou d'autres troubles du système olfactif [96]. Ainsi, aucune information n'est transmise au cerveau et aucune correspondance particulière n'est donc attribuée à une odeur. Ces phénomènes d'anosmie peuvent ne concerner que quelques odorants particuliers et dépendent étroitement du sujet. Par ailleurs, nos cellules réceptrices (axones olfactifs) se régénèrent tous les 30 à 90 jours [97], et il peut ainsi arriver que certaines odeurs ne soient pas perçues à un moment donné mais le soient plus tard. Notre faculté olfactive dépend également d'autres paramètres, tels que notre état de santé, notre niveau de fatigue ou encore notre état hormonal [98].

La perception olfactive d'une molécule est généralement exprimée par son seuil de détection (concentration minimale à partir de laquelle le composé odorant est détectable). Il est également possible de mesurer l'intensité ou la ténacité d'une odeur [93].

II.3.C *Techniques d'analyses chromatographiques*

Avant toute analyse, une phase de préparation de l'échantillon est requise et implique une extraction, généralement suivie d'un fractionnement plus ou moins approfondi. Ainsi, différents paramètres tels que la polarité des solvants d'extraction, les conditions d'extraction ou encore des étapes de fractionnement intermédiaires peuvent être mis en place. Dans cette première partie sur les techniques d'analyse, on s'intéresse aux composés non volatils, bien que l'analyse de composés volatils et semi-volatils soit également possible avec ces techniques.

II.3.C.a Analyse et séparation de composés non volatils : la chromatographie liquide

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) permet de séparer et visualiser rapidement les différents composés d'un mélange de molécules. La phase stationnaire est une plaque en verre couverte par de l'alumine, de la silice ou de la cellulose, sur laquelle est déposé, à l'aide d'un capillaire en verre, le mélange de composés à séparer. Par capillarité, le solvant de la phase mobile va permettre une séparation des composés au fur et à mesure qu'il montera le long de plaque. La plaque peut ensuite être observée sous lampe UV, et/ou être trempée dans différentes solutions permettant de révéler les composés, et d'identifier des familles de composés présentes dans un échantillon. Cette technique peut être automatisée et permettre une quantification [99].

La chromatographie liquide sur colonne ouverte permet de séparer des composés en solution, introduits dans la colonne chromatographique remplie d'une phase stationnaire, et élués avec un solvant adéquat. La phase mobile peut être composée d'un mélange de solvants miscibles afin d'éluier progressivement les composés adsorbés à la surface de la phase stationnaire. La phase stationnaire est un support plus ou moins poreux recouvert de silice (en phase normale par exemple), ou de silice greffée en groupes alkyles (en phase inverse notamment), qui aura de l'affinité avec les composés du mélange. En chromatographie en phase inverse, si l'échantillon comporte majoritairement des métabolites hydrocarbonés, un gradient de solvants du plus polaire au plus apolaire permettra de désorber progressivement les analytes, de plus en plus apolaires. Par ailleurs, la phase mobile peut n'être composée que d'un seul solvant (mode isocratique). Des appareils proposant une automatisation de cette technique sont disponibles sur le marché, et peuvent même permettre de détecter les composés grâce à un détecteur en sortie de colonne.

La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) est automatisée, et se base sur le même principe de partition des solutés entre les deux phases. Le principe est similaire à celui décrit plus haut mais les éléments (pompes, vannes d'injection, etc.) sont ici adaptés à de plus fortes pressions (50-150 bar), du fait de la fine granulométrie de la phase stationnaire utilisée. Par un couplage avec un détecteur, l'HPLC permet une analyse plus fine et une meilleure résolution. C'est une technique largement utilisée pour l'analyse des métabolites, et la phase stationnaire peut également être utilisée en phase normale, en phase inverse (silice greffée avec des groupes alkyles C6, C12 ou C18, nitrile, cyanopropyle, benzyle ou des cyclodextrines). En général, en phase inverse, on utilise comme phase mobile un mélange d'eau et d'acétonitrile, auxquels de l'acide trifluoroacétique ou de l'acide formique peut être ajouté, afin d'améliorer la résolution de composés non-neutres [100].

L'apparition de nouvelles techniques plus performantes telles que la chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) ont permis de diminuer le temps de l'analyse, tout en augmentant l'efficacité, la résolution et la vélocité linéaire de la phase mobile lors de l'analyse [101]. Pour ce faire, des colonnes chromatographiques plus courtes, de plus petits diamètres et avec des tailles de particules très fines ont

été développées. De plus, de fortes pressions (ca. 1000 bar) et de plus faibles débits sont mis en jeu, ce qui a également permis une amélioration du couplage UHPLC avec un détecteur en spectrométrie de masse (MS).

II.3.C.b Analyse et séparation de composés volatils et semi-volatils : la chromatographie gazeuse

Chromatographie en Phase Gazeuse et préparative

La chromatographie gazeuse (GC) est utilisée pour l'analyse de composés volatils et semi-volatils. Dans certains cas, des composés non volatils peuvent également être analysés après dérivatisation. Après injection de l'échantillon dans le liner d'un injecteur à haute température, le flux de la phase mobile amène les composés en phase vapeur vers l'entrée de la colonne capillaire. Ces composés vaporisés, entrent dans la colonne capillaire située dans un four thermostaté. Cette colonne est constituée d'une phase mobile (gaz vecteur inerte, H₂ ou He) et d'une phase stationnaire qui vont retenir préférentiellement ces molécules en fonction de leur affinité avec les phases. Ainsi, les molécules vont être éluées au fur et à mesure que la température du four augmente. Généralement, les molécules les moins volatiles sont éluées en dernier, mais la présence de groupes fonctionnels sur les composés va aussi être un paramètre qui va jouer sur la rétention des composés, et modifier leur affinité pour les phases. Ainsi, le choix de la phase stationnaire va permettre de moduler les phénomènes de partition des composés analysés. Par exemple, les composés acides, qui forment de larges pics après analyse sur colonne diméthylpolysiloxane, ou polyéthylène glycol (PEG), peuvent être mieux séparés et mieux résolus en étant analysés sur colonne FFAP, qui est une colonne spécifiquement modifiée (phase PEG modifiée à l'acide nitrotéréphtalique), afin de permettre l'analyse d'acides gras et phénols. Les phases stationnaires des colonnes peuvent être apolaires (diméthylpolysiloxane ou 95% diméthylpolysiloxane + 5% phényl), polaires (colonnes PEG), semi-polaires, des liquides ioniques, des phases poreuses solides ou encore des phases spécifiques (squalane, chirales, etc.) [102]. La vitesse linéaire et la nature de la phase mobile, ainsi que la longueur de la colonne sont également des paramètres qui peuvent être optimisés.

À la sortie de la colonne, les composés peuvent être détectés à l'aide de différents types de détecteurs, les plus courants étant le détecteur à ionisation de flamme (FID) et le spectromètre de masse (MS). Le détecteur FID transmet un signal électrique à chaque fois qu'il brûle un composé carboné sortant de la colonne. C'est un détecteur universel car il détecte ainsi toute sorte de composé organique, et il est également très fiable pour la quantification de composés [102]. Le détecteur MS détecte les ions issus de ces composés et permet ainsi une identification fiable et reproductible, cependant, puisque tous les composés ne s'ionisent pas de la même façon en fonction de leur nature, la quantification des composés est moins appropriée. En GC, les composés peuvent être identifiés de manière fiable par le calcul de leur indice de rétention (RI), ainsi que par la comparaison de leurs spectres de masse [103]. Ces spectres de masses obtenus sont propres à chaque composé (sauf isomères) et restent inchangés peu importe l'appareil utilisé, à condition, entre autres, qu'un même voltage d'ionisation soit appliqué. Ces spectres de masse sont ensuite comparés à ceux de la littérature ou ceux des bases de données afin de confirmer l'identification. Suite à l'injection d'une série d'alcanes linéaires, et par calcul *via* la formule de Van den Dool, le RI d'un composé peut être déterminé (interpolation linéaire).

La GC préparative couplée à un collecteur de fractions préparatives (PFC) fonctionne de la même façon qu'une GC analytique, mais est utilisée pour isoler les produits en sortie de colonne. L'objectif étant de

piéger un maximum de composés à séparer. Après injection, les composés en phase vapeur parcourent une colonne de plus gros diamètre interne soumise à un plus fort débit (colonne mégabore) et ayant une capacité de charge supérieure à une colonne analytique. La séparation sera moins résolue et moins efficace qu'en GC analytique, du fait d'un diamètre de colonne plus large. Les composés sont détectés en sortie de colonne par le FID, et, grâce à un commutateur de colonnes placé dans le four, ils seront dirigés vers la ligne de transfert rejoignant le PFC. Une photographie de GC-préparative est présentée ci-dessous.



Figure 6 : Photographie d'une GC couplée à un collecteur préparatif de fractions.

Le PFC permet de collecter les composés dans des pièges différents, afin de les séparer du reste de l'échantillon et de les analyser. La ligne de transfert maintenue à une température choisie, arrive dans l'enceinte du PFC thermostaté, par un élément (Preparative Switching Device : PSD) divisant le flux vers les différents pièges. Ce PSD comporte 8 entrées, une rattachée au capillaire de transfert venant du four de la GC, et sept autres capillaires désactivés en silice fondue, rejoignant l'entrée des pièges, avec différentes pièces permettant de garder une étanchéité au long du trajet. Les pièges sont des tubes en verre en forme de têtes d'épingles, et à leur sortie, le flux est dirigé vers des électrovannes qui peuvent être ouvertes ou fermées, permettant alors de diriger le flux au sein du PSD. Ce flux est modulé grâce à un système de contre-pression mis en jeu : lorsqu'une électrovanne est fermée, le flux se dirige seulement vers le (ou les) piège(s) ayant leurs électrovannes ouvertes, jusqu'à la sortie (air libre). Le passage du flux par le piège choisi permettra au composé de se condenser sur les parois du piège. Les temps de piégeage des composés sont définis sur un logiciel à la seconde près, en fonction des temps de rétention des pics obtenus sur le chromatogramme FID. Un schéma du fonctionnement du PSD est représenté ci-dessous.

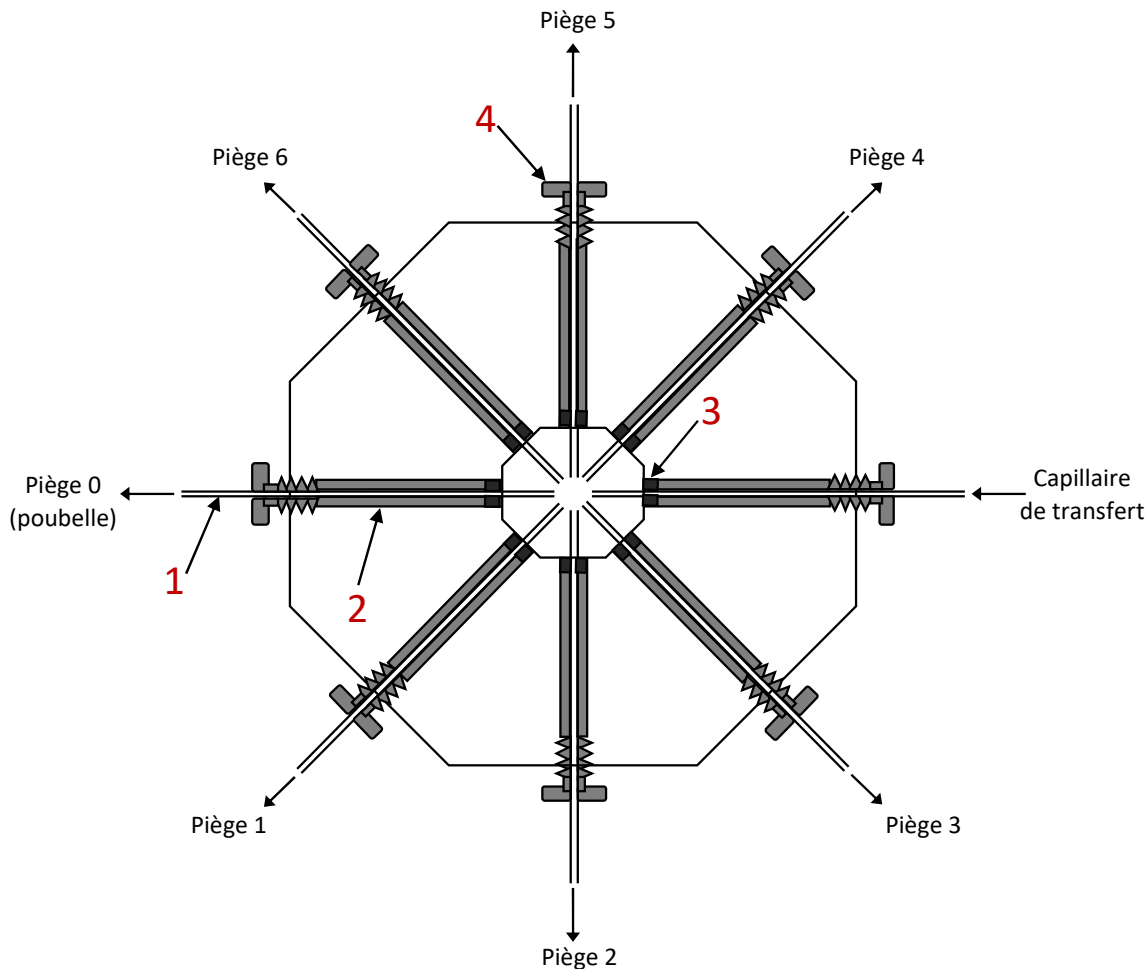


Figure 7 : Représentation schématisée d'un PSD.

1 : capillaire désactivé, 2 : isolant en métal, 3 : ferule ; 4 : noix.

Chromatographie Gazeuse couplée à l'Olfactométrie

Les méthodes d'olfactométrie ont commencé à se développer dans les années 80, mais jusqu'en 2014, on comptait encore moins de 1000 odorants à avoir été décrits par le biais d'analyses en GC-olfactométrie [104]. L'analyse est faite en GC analytique, et la détection des composés se fait généralement par un FID (ou par MS avec identification). En parallèle de la détection, un commutateur de colonne permet également de diviser le flux vers un port olfactif chauffé, où le paneliste sentira l'odorant en même temps qu'il sera détecté, et ainsi, fera correspondre un pic à une odeur. Selon les odorants recherchés, diverses méthodes d'analyse peuvent être utilisées : les méthodes de dilution, les méthodes de fréquence de détection, et les méthodes d'intensité.

La méthode de dilution la plus connue est l'Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA), où est reporté le plus bas niveau de dilution auquel l'odeur a pu être perçue. L'olfactogramme est alors constitué de bâtons représentant, pour un certain temps de rétention, le niveau de dilution le plus bas auquel l'odeur a pu être sentie. Une autre méthode de dilution (CHARM) existe et permet de rendre compte du temps pendant lequel l'odeur a été sentie, et ressemble davantage à un chromatogramme avec divers

paramètres observables (résolution, efficacité). Ces méthodes de dilution prennent beaucoup de temps puisqu'elles doivent être répétées plusieurs fois pour un même niveau de dilution mais aussi plusieurs fois à différents niveaux de dilution. Les analyses sont donc étalées dans le temps et faites à différents moments, ainsi, la variabilité des résultats obtenus dépend d'autant plus des différents états physiologiques des panelistes, à ces différents instants. Puisque ces techniques de dilution sont chronophages, de nombreux outils ont été développés pour permettre à plusieurs panelistes de faire une analyse en même temps (GC-O avec plusieurs ports olfactifs par exemple). L'AEDA est aujourd'hui une des méthodes les plus utilisées en GC-O, car elle est simple à mettre en œuvre, étant donné que le traitement des données ne nécessite pas de modéliser un chromatogramme car ni la durée ni l'intensité de l'odeur sentie n'est prise en compte [105].

D'autres méthodes basées sur la fréquence de détection d'un composé ont également été mises en place. On cherche dans ce cas à déterminer les odorants d'impact de la matrice, à une concentration fixe commune à tous les panelistes. Ce type de méthode ne nécessite donc pas beaucoup de répétitions, et ne nécessite pas non plus d'avoir un panel formé à l'analyse olfactive. En effet, dans la méthode GC-SNIF par exemple, il est question de reporter le temps auquel l'odeur a été perçue mais aussi le temps durant lequel cette odeur a été perçue. Ainsi, après trois répétitions de l'analyse, on obtient un aromagramme qui est la somme de tous les aromagrammes individuels des panelistes, où le pourcentage de NIF (Nose Impact factor) est tracé en fonction du temps. Plus le nombre de panélistes percevant un composé est élevé, plus il sera considéré comme un odorant d'impact important. Une odeur perçue par l'ensemble du panel correspond à 100% NIF [106,107]. On peut aussi demander aux panelistes de juger l'intensité de l'odeur perçue, afin d'affiner encore le tri des odorants. Il a été défini que le nombre minimal de panelistes requis pour mettre en place cette méthode devait être d'au moins 6 à 8 panelistes (idéalement 8 à 10), afin d'assurer une bonne répétabilité et reproductibilité. Une comparaison est possible avec la chromatographie GC-FID, afin d'attribuer un composé à un odorant d'impact spécifique [106].

II.3.D *Caractérisation des composés*

II.3.D.a Caractérisation par Spectrométrie de Masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique qui mesure le ratio masse sur charge d'un ion moléculaire (m/z) et de ses fragments, afin de permettre l'identification d'un composé. Cela va permettre de définir la composition d'un échantillon, par l'identification des molécules le composant. En MS, les molécules vont être ionisées, afin de générer les ions moléculaires des composés. On va ainsi pouvoir analyser des métabolites et molécules non volatiles. Le spectromètre de masse est constitué d'un injecteur où l'échantillon est introduit, d'une source d'ionisation produisant les ions, d'un analyseur permettant d'accélérer et donc de séparer les ions soumis à un champ électromagnétique, et d'un détecteur, qui sont des éléments dans un système sous vide. Le signal est ensuite transmis à un ordinateur capable de transformer les données acquises en un chromatogramme liant l'intensité du signal en fonction du m/z d'un ion formé, et capable de générer des spectres de masse des différents composés. Une analyse MS/MS est possible (et fréquemment utilisée en HPLC-MS) afin de fragmenter les ions moléculaires obtenus. L'ion moléculaire formé ainsi que ses fragments, reflètent directement les groupements de la molécule et sa structure [108]. Le système est alors composé de la source d'ionisation produisant les ions, d'un analyseur, d'une cellule de collision où seront fragmentés les ions précurseurs, d'un nouvel analyseur, puis d'un détecteur.

Pour des composés analysés en GC, l'impact électronique (EI) à 70 eV est utilisé couramment et permet d'arracher un électron à la molécule, et ainsi, l'ion moléculaire généré et les nombreux électrons libres dans la source permettent à nouveau de générer d'autres ions correspondants aux différents fragments du composé. Les spectres obtenus correspondent à un composé bien spécifique générant un spectre de masse unique, et qui peut être compilé dans une base de données.

Pour des composés analysés en HPLC, l'identification n'est pas aussi simple, car l'ionisation est généralement faite par une technique d'ionisation douce qui génère peu de fragments, et ne peut donc pas permettre une identification sans standard ou sans fragmentation (MS/MS) appliquée à l'ion moléculaire précurseur. La source d'ionisation est choisie en fonction de l'application souhaitée, et c'est fréquemment l'ionisation par électrospray (ESI) qui est utilisée en couplage avec l'HPLC, car l'ionisation se fait à une pression voisine de la pression atmosphérique. Un haut voltage est appliqué sur l'échantillon liquide qui sort de la colonne, et, grâce à un gaz de nébulisation, crée alors un aérosol. Le flux de composés ainsi chargé sera concentré sous forme de petites gouttelettes qui s'évaporeront et se fragmenteront en ions précurseurs (ions moléculaires) au fur et à mesure de leur passage jusqu'à l'analyseur, sous vide [109].

Les analyseurs vont séparer les ions formés, grâce à un champ électromagnétique qui va être appliqué afin de trier les ions. Les analyseurs les plus couramment utilisés sont les quadripôles et triple quadripôle, les trappes ioniques et orbitrap, et les analyseurs à temps de vol.

Dans un analyseur quadripôle, souvent couplé à une analyse en GC, une différence de potentiel électrique va accélérer les ions, et des tensions électriques appliquées sur les électrodes vont permettre de sélectionner les ions (ou pas) qui passeront dans le détecteur. Dans un analyseur à triple quadripôle, les ions parents sont sélectionnés et peuvent passer dans la cellule de collision pour être fragmentés en ions fils, qui seront sélectionnés et conduits vers le détecteur.

Dans un analyseur à trappe ionique, les ions sont piégés dans une cavité, où un champ électromagnétique est appliqué dans les pôles de la cavité. Les ions sont donc en mouvement dans la trappe, et une tension électrique spécifique est appliquée à un certain moment afin de sélectionner un certain m/z , conduisant à l'éjection de(s) l'ion(s) d'intérêt, vers le détecteur [110]. Dans l'orbitrap, les ions tournent autour d'une électrode, produisant ainsi un signal sinusoïdal qui correspond aux rapports m/z des ions. On peut ainsi obtenir les spectres de masse de tous les ions moléculaires en même temps. Dans ce système, l'expérience peut être répétée plusieurs fois, et il est ainsi possible d'observer des ions présents même en très faible quantité, ce qui fait la forte sensibilité de ce système [111]. Dans un TOF, une différence de potentiel électrique est appliquée, et les particules sont ainsi accélérées et sélectionnées en fonction de leur vitesse, ce qui en fait un analyseur très sensible. Tous les ions produits sont analysés, et on détermine le m/z d'un ion, et donc la masse d'un composé avec une forte précision, à partir du temps qu'il a mis à parcourir une distance fixe [80].

Avec un orbitrap, tout comme avec un TOF, les ions sont soumis à des champs électrostatiques ce qui résulte en une période d'oscillation (ou un temps de vol) lente des ions, par rapport à leur rapport masse sur charge, permettant ainsi une très forte résolution (précision accrue).

Ces analyseurs ont tous des avantages et des inconvénients, et peuvent être choisis en fonction de la classe de composés analysés, de leur taille, mais aussi de l'objectif de l'analyse. Par exemple, un analyseur triple quadripôle sera adéquat pour la quantification, alors que le TOF ou l'orbitrap sera très adapté à l'identification précise du composé, car ils fournissent avec précision les masses des ions.

II.3.D.b Autres techniques d'analyse et caractérisation

Une autre technique de caractérisation d'un composé que l'on a pu utiliser dans ce travail est la technique de RMN, qui est basée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques tels que le carbone 13 ou l'hydrogène qui le composent [109]. Lorsque ces noyaux sont soumis à un champ magnétique, leurs spins sont orientés selon deux niveaux d'énergie. Lorsqu'un second champ magnétique de fréquence correspondant à la fréquence de Larmor des noyaux est appliqué, l'énergie va être absorbée par les noyaux et leur aimantation va ainsi être modifiée (résonance). La différence d'énergie entre les deux niveaux, dépendant du rapport gyromagnétique du noyau mais aussi du champ magnétique, doit être la plus grande possible si on veut augmenter la résolution de la technique. La relaxation des noyaux va induire une variation de l'intensité du courant en fonction du temps, et, par transformée de Fourier, on obtient des spectres RMN de l'intensité du signal en fonction de la fréquence (ppm).

On peut ainsi choisir d'appliquer un champ magnétique pour l'analyse des protons d'une molécule, puis s'intéresser aux carbones de la molécule (moins sensible) afin de déterminer la structure du composé. On s'intéresse dans un premier temps à sa structure bidimensionnelle à l'aide de tables de données regroupant les déplacements chimiques les plus fréquents en fonction des groupes fonctionnels et des motifs structuraux de composés, puis, à l'aide de cartes RMN comme la ROESY ou la NOESY, on va pouvoir déterminer l'agencement spatial des protons des composés, et donc sa structure tridimensionnelle. Une augmentation de la sensibilité peut être faite par le choix d'une meilleure sonde telle que la cryosonde par exemple, qui va permettre de réduire le bruit de fond et donc d'augmenter le rapport signal sur bruit.

La spectrophotométrie UV-visible a également été utilisée, et s'effectue sur des composés capables de filtrer la lumière visible pour ne laisser passer qu'une certaine longueur d'onde. En effet, une molécule peut être caractérisée par les interactions électromagnétiques entre ses atomes, qui peuvent absorber ou émettre des rayonnements électromagnétiques. Il est ainsi possible de caractériser un composé par son coefficient d'absorption, et de déterminer la nature de ses liaisons et groupes fonctionnels, grâce à cette technique. On peut également obtenir une mesure quantitative du composé dans l'échantillon.

D'autres techniques de caractérisation d'un composé peuvent également être mises en place, et sont basées sur les propriétés optiques (polarimétrie) et vibrationnelles des molécules (infra-rouge).

III. ÉTUDE DE TROIS PLANTES A EXUDATS : L'ENCENS, LA MYRRHE ET LE CISTE

Pour finir ce premier chapitre, on présente ici les caractéristiques botaniques et phytochimiques des trois matières premières végétales aromatiques étudiées durant ce travail de thèse.

III.1. L'encens

III.1.A Description taxonomique

L'encens est le nom commun donné aux exsudats de l'écorce des arbres du genre *Boswellia*, appartenant à la famille des *Burseraceae*. La famille des *Burseraceae* comprend 19 genres classés dans 5 groupes, comme présenté dans le schéma ci-dessous [113].

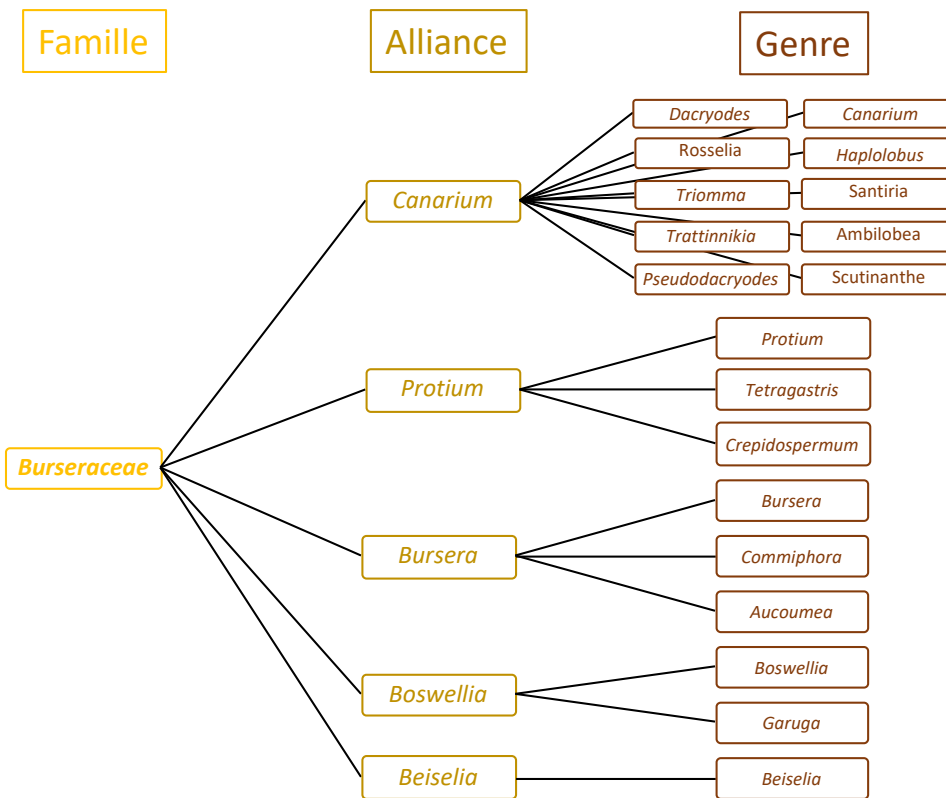


Figure 8 : Classement phylogénétique des *Burseraceae*.

La plupart des espèces d'encens sont originaires d'Eurasie, d'Afrique du Nord et d'Afrique Sub-Saharienne [113]. De nos jours, on trouve principalement 25 espèces du genre *Boswellia*, et ces arbres sont répandus en Inde, en Arabie et sur la côte nord-est de l'Afrique (Éthiopie, Somalie et Érythrée) [114]. Les espèces les plus utilisées sont *B. carterii* (syn. *B. sacra*), majoritairement trouvées en Afrique et en Arabie mais aussi *B. serrata* et *B. frereana*. En Inde, c'est l'espèce *B. serrata* qui est la plus représentée [115] alors que *B. frereana* est principalement trouvée en Somalie [39]. Certaines espèces sont également présentes sur l'île de Socotra, comme les espèces *B. discorides*, *B. elongata* et *B. socotrana* qui y sont endémiques [116]. Une espèce également présente et cultivée en Afrique, notamment au Soudan, en Éthiopie et en Érythrée,

est l'espèce *B. papyrifera* [117,118]. Un *Boswellia* moins étudié et cultivé au Burkina Faso, Mali du Sud, Cameroun ou encore au Nord du Nigeria est l'espèce *B. dalzielii* [119].

III.1.B Description botanique

Les *Boswellia* sont des arbustes généralement de plus petite taille que les autres arbres de la famille des *Burseraceae* et qui peuvent être pachycaules. Chez la plupart des espèces, l'écorce du tronc et les branches pèlent [120]. Ils ont majoritairement des feuilles alternées imparipennées et pubescentes (rameaux terminaux) et, chez les espèces du genre *Boswellia*, les folioles, tout comme les feuilles (parfois caduques), peuvent être alternés voire subalternés [115]. Une photographie de *B. sacra* est présentée ci-contre.



Figure 9 : Photographie d'un jeune arbre à encens *B. sacra*.

Par Mauro Raffaelli, prise au Parc Naturel Wadi Dowkah (Dhofar, Oman), en Mars 2014.

Les fleurs sont bisexuelles chez presque toutes les espèces d'encens. Elles sont actinomorphes et périgynes chez les genres *Bursera*, *Boswellia* et *Commiphora*, et leurs pétales sont rarement imbriqués chez le genre *Boswellia*. Les canaux sécréteurs résinifères intralibériens, situés sous l'écorce des arbres à encens, permettent à la résine odorante de suinter lorsque l'écorce est blessée, donnant ainsi les précieuses "larmes" de gomme-résine qui sèchent et durcissent sur l'arbre. Cette résine est jaune pâle à marron clair [121]. Ces espèces, poussent jusqu'à 1500 mètres d'altitude, sur des sols plutôt calcaires, limoneux ou montagneux [115,122].

III.1.C Récolte

L'exsudat d'encens est obtenu suite à l'entaillage des arbres ("tapping"), à l'aide d'un outil de coupe permettant de faire des incisions dans l'écorce de l'arbre afin d'obtenir la gomme-résine odorante. Plusieurs grades permettent de caractériser la qualité d'une résine, en fonction des contaminants présents dans celle-ci lorsqu'elle se solidifie. Ensuite, la résine est laissée à durcir sur l'arbre ou ramassée puis stockée dans des endroits ventilés (drainage) avant d'être vendue. La plupart du temps, la récolte des encens a lieu pendant la ou les saisons sèches, afin d'éviter le lessivage de la résine par la pluie. Les arbres sont entaillés environ 12 fois/an selon l'âge de l'arbuste, ce qui donne 1-3kg de résine par arbre [120].

Cependant, il faut également respecter des temps de repos pour l'arbre, afin qu'il ne meure pas. Par exemple, après un an de saignée sur les espèces de *B. papyrifera*, on les laisse se reposer pendant une période de 3 ans, parfois jusqu'à 5 ans.

III.1.D Composition chimique

Les exsudats d'encens sont constitués d'environ 60% de résine, de 3 à 10% d'huile essentielle, et de 10-20% de gomme (osides : polymères de galactose, arabinose, etc. [123]), et parfois de composés azotés (<0,5%) et de mucilages [115].

Les composés volatils majoritaires trouvés dans les différentes huiles essentielles d'espèces communes de *Boswellia* ont fait l'objet de nombreux travaux [39,124,125]. L'huile de *B. sacra* est riche en α -pinène et α -thujène, limonène et sesquiterpènes (β -caryophyllène, élémènes, etc.), celle de l'encens indien *B. serrata* renferme des phénylpropanoïdes tels que l'estragol, le méthyl eugénol, et contient davantage de α -thujène que d' α -pinène. L'huile essentielle de *B. frereana* est majoritairement composée de monoterpénoïdes (α -thujène, p-cymène, sabinène) [126] et celle de *B. papyrifera* est caractérisée par un fort taux d'esters linéaires (acétate d'octyle), d'octanol et diterpénoïdes (incensole, verticillatriène) [125].

La structure de certains de ces composés est représentée sur la figure ci-dessous.

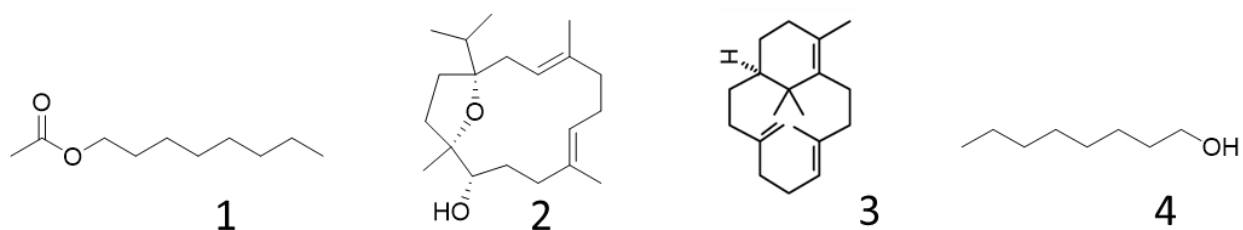


Figure 10 : Structure des principaux composés volatils de *B. papyrifera*.

1 : acétate d'octyle, 2 : incensole, 3 : verticillatriène, 4 : octan-1-ol.

De nombreux cembranoïdes semi-volatils ont également été reportés chez la plupart des espèces d'encens. Par exemple, on trouve le cembrene ou le cembrène A chez toutes les espèces citées précédemment, mais on trouve également d'autres cembranoïdes qui sont plus spécifiques de certaines espèces, notamment avec l'acétate d'incensole trouvé chez *B. papyrifera* et *B. carterii* seulement, ou encore les boscartines, reportés seulement chez *B. carterii*, jusqu'à présent [127].

La partie non volatile de la résine a aussi été beaucoup étudiée dans diverses espèces d'encens, et ses propriétés médicinales sont attribuées aux acides triterpéniques qui la composent. Parmi ces acides, les plus communs sont les acides boswelliques, et plusieurs méthodes d'extraction et de quantification ont été développées afin d'extraire et valoriser ces composés [128–135]. Les olibanumols, les acides tirucalliques, oléaniques, ursoliques et les amyrynes ont également été identifiés dans la résine d'encens, et certains ont également des activités biologiques remarquables [135–137].

III.1.E Usages médicaux, religieux et en parfumerie

L'encens a toujours fait partie de rites religieux. Durant l'Antiquité déjà, la population brûlait de l'encens lors de cérémonies et rites religieux, dans la religion juive ou chrétienne, en offrande aux dieux, ou lors des cérémonies funéraires [138]. La résine était souvent utilisée en fumigation, et de nombreux

échantillons archéologiques d'encens pyrolysés ont été découverts [4]. Aujourd'hui encore, dans plusieurs religions, l'encens est utilisé et même mentionné dans les textes religieux tels que dans la Bible [139].

Certaines propriétés médicinales de l'encens seraient en partie dues à certains composés non volatils de la résine tels que des acides triterpéniques, qui ont notamment montré de fortes propriétés anti-inflammatoires et analgésiques [140–142], et également anti-oxydantes et anti-cancéreuses [134,137,143–146]. Certains composés semi-volatils (cembranoïdes ou diterpénoïdes) ont également montré un potentiel anti-inflammatoire ou anti-dépressif, et ont suscité l'intérêt de nombreux groupes de recherche ces derniers temps [127,147–149].

La résine provenant majoritairement d'Afrique, de type *B. carterii*, est connue pour avoir une odeur typique boisée, balsamique, alors que celle de *B. papyrifera* est plutôt sucrée, verte, fleurie et son huile essentielle a des notes noisette, vertes [115,150]. Dans la littérature, on peut recenser quelques travaux qui ont été menés sur les constituants odorants de *B. sacra* par GC-O (AEDA) qui ont mené à l'identification de la rotundone et la mustakone [151,152]. C'est seulement en 2016 que les contributeurs majeurs de l'odeur de l'encens ont été identifiés comme étant les acides trans- et cis-olibaniques [acides (1S,2S)-(+)-trans- et (1S,2R)-(+)-cis-2-octylcyclopropyl-1-carboxyliques] [153]. Ces acides, présents à l'état de trace dans l'huile essentielle, lui confèrent sa note typique de « vieille église » et ont été identifiés dans les huiles essentielles de plusieurs espèces de *Boswellia* présentant des compositions très différentes en termes de composés majoritaires.

III.1.F *Problématique*

Il n'y a qu'une seule étude à propos des acides olibaniques, bien que ce soient les odorants d'impact majeurs de l'encens. Ainsi, il est primordial de continuer la recherche sur le pouvoir de ces odorants, dans plusieurs résines, et il serait particulièrement intéressant de développer une méthode pour leur dosage.

Par ailleurs, certaines espèces d'encens ont été peu étudiées. Par exemple, les espèces de Socotra sont mal connues, du fait du contexte géopolitique qui ne facilite pas l'accès aux ressources naturelles. De même l'espèce *B. dalzielii* a été également mise en lumière plus récemment et est donc moins documentée, la seule étude sur son huile essentielle ayant été publiée en 2019 [154]. Dans notre travail, nous nous sommes donc attachés à mieux caractériser les constituants volatils et non volatils de *B. dalzielii* afin de mieux cerner son intérêt pharmaceutique par rapport à d'autres résines d'encens.

La composition de *B. papyrifera* a été beaucoup moins étudiée que celle de *B. sacra*, et la fraction diterpénique semble incomplètement caractérisée dans la littérature. Ainsi, afin de contribuer à une meilleure connaissance sur les diterpènes de *B. papyrifera*, nous avons également entrepris de nous attacher à leur analyse approfondie.

III.2. La myrrhe

III.2.A *Description taxonomique*

La myrrhe est le nom commun donné aux exsudats de l'écorce des arbres du genre *Commiphora*, appartenant, comme les espèces d'encens, à la famille des *Burseraceae*. Le genre *Commiphora* compte environ 200 espèces, originaires d'Afrique Sub-Saharienne, et de Madagascar principalement. Ces arbres poussent à des altitudes comprises entre 200 et 1500 mètres au-dessus du niveau de la mer, et sont principalement présents aujourd'hui dans le nord-est de l'Afrique, dans la péninsule arabique, en

Amérique du Sud, à Madagascar et en Inde [155]. La plus grande diversité de *Commiphora spp.* se trouve en Somalie. La distribution pantropicale des *Burseraceae* pourrait s'expliquer par plusieurs événements migratoires qui se sont produits principalement au cours de l'Éocène, lorsque les *Commiphora spp.* se sont dispersées de l'Amérique du Nord vers l'Europe et l'Asie. Ensuite, leur dissémination s'est poursuivie au sein de l'Afrique continentale, grâce à des températures élevées et à la route commerciale de l'encens à partir du premier millénaire avant JC [156]. Les plus anciens fossiles des espèces de *Commiphora spp.* retrouvés datent de l'ère Eocène-Oligocène [157,158].

Les espèces de myrrhe les plus couramment utilisées sont les cinq suivantes : *C. myrrha*, *C. mukul*, *C. erythrea*, *C. opobalsamum* et *C. guidotti*, mais d'autres espèces telles que *C. kua*; *C. socotrana*, *C. africana*, *C. habessinica*, *C. holtziana*, *C. sphaerocarpa* ou encore *C. wildii* ont également été employées par les populations locales.

III.2.B Description botanique



Figure 11 : Photographie d'une résine de *C. myrrha*.

Les arbres à myrrhe atteignent de 3 à 10 m de hauteur environ (ils sont plus petits en Arabie du Sud), et sont caractérisés par leurs branches aux nombreuses épines [155]. La majorité des espèces ont des feuilles persistantes ovales trifoliées imparipennées, très petites et peu abondantes, comme par exemple chez *C. myrrha* [139]-[159]. Les fleurs sont également petites et de couleur blanche à verte chez *C. myrrha*. Ces fleurs dioïques ont différentes formes selon les espèces, on peut les trouver seules, en panicules, en cymes ou en racèmes. Les fruits ovoïdes mesurent environ 12-16mm de long, et contiennent peu de graines. Tout comme pour les espèces d'encens, les arbres à myrrhe sécrètent une gomme-résine lorsqu'ils subissent des blessures mécaniques, ou biotiques, et est présentée dans la figure ci-contre.

III.2.C Récolte et commerce

En Somalie, il y a deux périodes de "tapping" pour la myrrhe avec environ 8 incisions par arbre à chaque période. Le temps de repos est approximativement de 6 mois à 2 ans, et si cette période n'est pas respectée, l'arbre est exposé à des risques de mort plus élevés [120].

Dans le passé, la principale source de myrrhe commercialisée était celle provenant de l'espèce *C. erythrea*, connu sous le nom d'"opopanax". Aujourd'hui, la myrrhe la plus commune provient de *C. myrrha* var. *molmol*, et ses principaux producteurs sont situés en Somalie et en Éthiopie et exportaient près de 6000 tonnes/an à la fin des années 80 [160].

III.2.D Composition chimique

L'étude de la composition volatile de la résine de 25 espèces de myrrhe les plus utilisées fait l'objet d'une revue scientifique en cours de préparation, et dont les composés sont reportés en annexe.

La myrrhe étant également une gomme-résine, elle possède une partie gomme hydrosoluble et une partie résine, renfermant l'huile essentielle, soluble dans l'alcool. Les principaux constituants de la résine sont des sesquiterpènes à squelettes divers, présentant la particularité de comporter un cycle furanique, tels que des furanogermacrane, des furanoeudesmanes et des furanoelemans, représentant environ 50-70% de l'huile totale, selon la littérature [161]. Ces valeurs peuvent varier selon les espèces, par exemple, Marcotullio et al. [162] ont rapporté que la résine de *C. erythrea* contient des furanosesquiterpènes (50.3%), des sesquiterpénoïdes (2.5%), des monoterpènes (6.1%), des monoterpénoïdes (0.4%), des sesquiterpènes (36.6%) et des sesquiterpénoïdes (0.9%), alors que Grbić et al. [163] ont reporté que chez *C. myrrha*, il a été vu 59% sesquiterpènes, 38% de sesquiterpénoïdes et 0.3% monoterpènes.

En ce qui concerne la composition de l'huile essentielle de *C. myrrha*, elle a longtemps été sujette à débats, étant donné que de nombreux auteurs ont rapporté des compositions de *C. myrrha* complètement différentes, notamment sur le plan qualitatif [164–166]. Ainsi, face à ces divergences, Dekebo et al. [167] ont décidé de comparer les compositions de l'espèce *C. myrrha* avec d'autres espèces, souvent confondues avec *C. myrrha* telles que *C. erythrea* ou *C. sphaerocarpa*.

Aujourd'hui, il est admis qu'une composition "typique" de l'huile essentielle de myrrhe, qui peut varier quantitativement, contient comme composés majoritaires du furanoeudesma-1,3-diène, du furanodiène, du lindestrène et du curzérène, représentés ci-après [161,168–172]. La revue en préparation, jointe en annexe 6, recense les composés volatils trouvés dans diverses espèces de *Commiphora*.

De même, certains composés peuvent être considérés comme des marqueurs chimiques pour aider à l'attribution correcte d'une espèce. Par exemple, le mukulol, les guggulstérones ou le camphorène n'ont été trouvés que dans le *C. mukul*, et l'ocimène a été trouvé dans l'opopanax mais pas dans *C. myrrha*, ce qui peut être un indice pour différencier ces espèces [170,173–178].

III.2.E Usages médicaux, religieux et en parfumerie

La myrrhe a longtemps été utilisée pour sa valeur religieuse et est encore utilisée dans de nombreux rites et croyances. Elle est même mentionnée dans la Bible, avec l'encens, comme un cadeau offert au Christ par les Rois Mages. Par ailleurs, les Romains brûlaient également de la myrrhe lors des enterrements, pour les croyances mais aussi pour masquer l'odeur des corps lors de crémations [155].

Par ailleurs, du fait de ses vertus médicinales, la myrrhe était utilisée en Chine pour traiter les problèmes de peau à l'époque de Kaibao, en 973 après J.-C., en Inde en médecine ayurvédique, et par les Romains pour traiter les vers, les dents et les douleurs abdominales. En outre, au 4^{ème} siècle avant J.-C., Hippocrate déclarait déjà que la myrrhe était un "encens curatif" [155]. En médecine chinoise, la myrrhe (*C. opobalsamum* et *C. myrrha*) était utilisée pour traiter certains problèmes de peau, les ulcères buccaux, la douleur, les maladies inflammatoires, les maladies du sang et l'arthrite [179]. En plus de ces applications le guggul (*C. mukul*) de l'Inde était également utilisé depuis 3000 ans avant J.-C. en médecine ayurvédique pour traiter les problèmes de santé liés à l'obésité [179]. D'autres espèces de *Commiphora* ont montré qu'elles présentaient des propriétés antimicrobiennes et étaient utilisées contre les infections et certaines espèces comme *C. erythrea* ou *C. myrrha*, et étaient également utilisées contre les tiques [168,180,181]. À l'époque moderne, et grâce aux avancées scientifiques, des propriétés anti-tumorales et anti-inflammatoires ont été vues chez *C. myrrha* et *C. mukul* [164,171,177,182,183]. La myrrhe a également été évaluée pour ses propriétés antioxydantes, antiulcéreuses, hépatoprotectrices et hypolipidémiques. Plusieurs travaux ont été publiés sur le potentiel santé de la myrrhe, notamment avec la monographie de

l'European Scientific Cooperative on Phytotherapy qui mentionne les propriétés anti-arthrite et anti-dyspepsie de *C. myrrha*. Le potentiel antimicrobien et/ou anti-oxidant de l'huile essentielle de plusieurs espèces de myrrhe a également été observé [164–166,184–188].

La myrrhe est aussi très appréciée pour ses propriétés olfactives. Aujourd'hui encore, elle entre dans la composition de nombreux parfums, tels que "Burberry London pour homme" ou "Myrrhe impériale" d'Armani. Cependant, la littérature est assez pauvre sur la nature exacte des constituants odorants de la myrrhe : les principaux travaux existants ont été menés par Mookherjee et al. en 1983 et Hasegawa en 2013, et ont avancé que les composés majoritaires de la myrrhe, le lindestrene et le furanoeudesma-1,3-diene, lui conféraient ses notes chaudes et balsamiques, avec le β -ocimène et quelques sesquiterpènes (santalène, bergamotène, bisabolène, etc.) [189,190]. Le curzerene (odeur verte, géranium), mais aussi la curzerenone (boisé), la dihydropyrocurzerenone (typique, note « encens »), et la 3-methoxy-10(15)-dihydrofuranodien-6-one (rose, thé) ou encore la furanodienone (sucré doux, coumarine, tabac) contribuent aux propriétés olfactives de la myrrhe.

III.2.F *Problématique*

Malgré l'utilisation et le commerce de la myrrhe depuis plus de deux millénaires, l'identification de ses composés odorants reste partielle et mérite d'être complétée par une étude analytique détaillée. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est d'approfondir les connaissances sur les odorants d'impact de la myrrhe en se basant sur des travaux d'isolement et des analyses sensorielles impliquant un panel conséquent.

III.3. Le ciste

III.3.A *Description taxonomique*

La famille des *Cistaceae* comprend 180 espèces regroupées en 8 genres (*Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum* et *Xolantha*), dont 5 sont présents dans la région Méditerranéenne, du Sud de la France, à la Péninsule Ibérique, en passant par le Maroc ou encore l'Algérie. Seulement 20 espèces sont connues dans le genre *Cistus*, et diffèrent des autres genres de par les caractéristiques et les informations génétiques relatives aux organes sexuels des *Cistus* (fleurs, pollen). Certaines de ces espèces sont regroupées dans des sous-genres, par exemple, le ciste ladanifère, aussi appelé ciste à gomme, appartient au sous-genre des *Leucocistus*, et on peut même trouver des sous-espèces de *C. ladanifer*. Par exemple, on trouve le *Cistus ladanifer* subsp. *ladanifer*, subsp. *africanus* ou subsp. *sulcatus* [191]. Plusieurs événements de dispersion longue-distance de cette espèce ont eu lieu au cours de l'évolution, cependant, par l'utilisation de marqueurs moléculaires, on peut déterminer la provenance géographique des différentes lignées de population de *C. ladanifer*.

III.3.B *Description botanique*

Le ciste ladanifère est un arbuste ligneux, poussant sur des sols calcaires, siliceux ou acides d'origine schisteuse, granitique ou gréseuse. Ce sont des plantes pérennes, pouvant vivre dans des conditions de sécheresse difficiles (xérophile), et pyrophytes. Elles mesurent jusqu'à 2m de hauteur et ont été trouvées jusqu'à 1500 mètres d'altitude. C'est un arbuste au port érigé qui possède des feuilles vertes lancéolées à la face supérieure glabre et à la face arrière couverte d'un tomentum blanc. Les feuilles sont opposées et sessiles sauf chez la sous-espèce *sulcatus*. Le stigmate est sessile et contient de nombreuses étamines inégales et le fruit est une capsule loculicide avec 5 à 12 locules. Les espèces de *C. ladanifer* ont les fleurs

les plus grandes (5-10 cm) du genre *Cistus* et sont composées de trois sépales ovales et cinq pétales. Selon la sous-espèce de *C. ladanifer*, les pétales des fleurs peuvent être blancs (var. *albiflorus*) ou avoir une tache rouge à marron à la base de chaque pétale (var. *maculatus*). Cette espèce est également caractérisée par sa production de résine labdanum, très odorante et collante, produite par des trichomes sécréteurs localisés sous la cuticule des feuilles principalement [191]. Une photographie de la plante est montrée ci-contre.



Figure 12 : Photographie d'un ciste à gomme *C. ladanifer*.

III.3.C *Composition chimique*

La composition chimique de l'huile essentielle de ciste ladanifère a été étudiée par de nombreux auteurs, et est notamment caractérisée par sa composition très riche en monoterpénoïdes et sesquiterpénoïdes (>75%). Cette essence présente une importante teneur moyenne en α -pinène (39%), suivie par le viridiflorol (12%), le lédol (3%) et l'acétate de bornyle (3%). Cependant, en analysant les plantes une à une, de fortes variations quantitatives ont été observées dans la teneur de certains constituants, avec certains échantillons ne contenant que 2% d' α -pinène [192–194]. Robles et al. [195] ont également montré que la composition chimique de l'huile pouvait venir de la variété analysée, mais aussi du site sur lequel la plante avait été récoltée. Parmi les autres constituants notables, on peut citer la 2,2,6-triméthylcyclohexanone, qui peut même faire office de marqueur chimique de cette espèce. L'huile essentielle contient également des alcools diterpéniques tels que le 15-nor-labdan-8-ol, le labd-8(17)-èn-15-ol, le labd-7-èn-15-ol et le labd-8-èn-15-ol [196,197].

Le « labdanum » désigne le résinoïde préparé à partir du ciste ladanifère. Pour l'obtenir, on plonge les rameaux feuillus dans de l'eau chaude carbonatée afin d'éliminer les cires épicuticulaires et les composés lipidiques. Le milieu est ensuite acidifié, et on obtient la résine brute qui est essorée et séchée. Pour finir,

la résine est lavée à l'éthanol puis concentrée, et le résinoïde ainsi obtenu présente une forte odeur ambrée, boisée, balsamique. Les composés les plus représentés dans l'huile essentielle de labdanum, selon une étude de Weyerstahl et al. [196], sont représentés dans la figure ci-après.

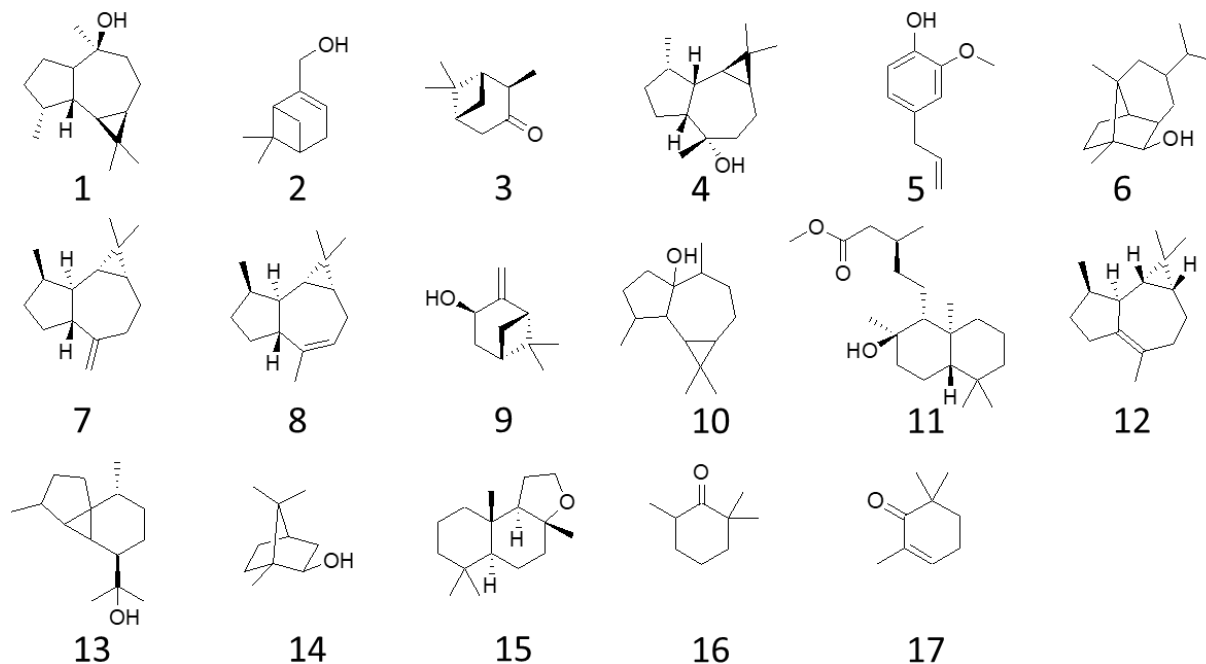


Figure 13 : Composés volatils majoritaires chez *C. ladanifer*.

1 : viridiflorol, 2 : myrténol, 3 : pinocamphone, 4 : lédol, 5 : eugenol, 6 : copabornéol, 7 : aromadendrène, 8 : alloaromadendrène, 9 : trans-pinocarvéol, 10 : palustrol, 11 : labdanoate de méthyle, 12 : lédène, 13 : cubeban-11-ol, 14 : bornéol, 15 : ambrox, 16 : 2,6,6-triméthylcyclohex-2-enone, 17 : 2,2,6-triméthylcyclohexanone.

On note aussi la présence de labdanes comme l'acide labdanolique [198], des esters de méthyle (6,8(17)-labdadien-15-oate, 8- α -méthoxylabda-15-oate, 6-oxo-7-labden-15-oate, 7-oxo-8-labden-15-oate, le 6 β -acetoxy-7-oxo-8-labden-15-oate, labdanolate, 8 α -hydroxy-13-(E)-labden-15-oate et le méthyl 7 α -hydroxy-8-(17)-labden-15-oate) [199], ou encore le 15-acétoxy-labdan-8-ol, le 15-acétoxy-labd-8,9-ène, l'acide labdenoïque ou l'acide 8- α -méthoxy-labdan-15-oïque [200].

III.3.D Usage en parfumerie et autres rôles

Le ciste était autrefois utilisé en fumigation et pour ses "vertus astringentes" contre les hémorragies [201]. L'huile essentielle et les extraits alcooliques ou aqueux de *C. ladanifer* ont montré des propriétés médicinales telles que des activités hypoglycémiques et hypolipidémiques [202,203], anti-inflammatoires [204,205] et un potentiel anti-oxydant et anti-cancéreux [206]. Pour finir, le ciste ladanifère est également utilisé en cosmétique, pour ses activités anti-tyrosinase, anti-élastase et protectrice (UV, activités anti-oxydante et anti-inflammatoire) [200,207].

Pour ce qui est des usages du ciste pour ses propriétés parfumantes, les écrits de Pline mentionnent que la résine de ciste était collectée à l'aide de fouets à lanières de cuir sur le pelage des animaux qui pâturaient dans les zones à ciste, et était ensuite utilisée pour son odeur « animale ». Par ailleurs, un échantillon de *C. ladanifer* a été retrouvé dans une tombe carthaginoise, datant du 5^{ème} - 6^{ème} siècle avant J.C. [201]. A nouveau, malgré cette utilisation fort ancienne et les nombreux travaux analytiques publiés

sur cette espèce, les composés contribuant à l'odeur globale du ciste sont peu détaillés dans la littérature. En effet, en dehors de l'ambrox, oxoisoambrox et decahydronaphthalenol déjà bien connus comme ingrédients odorant en parfumerie, le peu d'études mentionnant les propriétés olfactives des autres composés du ciste ont pointé la 2,2,6-triméthylcyclohexanone (balsamique) et la 2,6,6-triméthylcyclohex-2-enone qui a une odeur plus boisée, le (Z)-3-hexen-1-ol (frais) ou encore le 2-phényléthanol (floral) [208]. Par ailleurs, Ohloff et al. ont rappelé que le caractère fumé, cuir du ciste venait d'un mélange de 25 composés phénoliques et leurs éthers méthyliques tels que les isomères du 3,5-diméthylsalicyaldéhyde, le 6-méthyle-2-hydroxyacétophenone ou l'hydroxycuminal. Ces auteurs recensent aussi certaines lactones comme étant responsables des notes coumarine, un caractère mousse de chêne venant du β -orcinol carboxylate, et mentionnent certains acides qui confèrent l'odeur résineuse du labdanum. Les aldéhydes campholéniques contribuant également largement à l'odeur du labdanum. De plus, le caractère floral viendrait principalement du viridiflorol et du ledol, de l'oxyde de rose, et le côté herbacé caractéristique du labdanum viendrait des tagétones [209].

III.3.E *Problématique*

L'huile essentielle de *C. ladanifer* a une odeur complexe caractérisée par de multiples facettes, qui reflète finalement bien la complexité chimique de cette matière première, par le nombre et la structure de ses constituants. Au vu du peu de données disponibles dans la littérature sur la nature précise des odorants du ciste, nous avons choisi d'entreprendre une étude analytique approfondie impliquant la GC-O afin d'apporter quelques réponses.

IV. OBJECTIFS

Dans le cadre de ce travail de thèse, on s'intéresse particulièrement à trois matières premières aromatiques productrices de résines et gommés-résines odorantes : le ciste, la myrrhe et l'encens, connues depuis des millénaires pour leurs propriétés médicinales et parfumantes.

Afin de mieux connaître les constituants de ces matières premières, on s'intéressera dans un premier temps à leurs composés non volatils et semi-volatils. Ainsi, on se concentrera d'abord sur les méthodes d'extraction des acides triterpéniques d'intérêt médicinal de la résine d'encens *Boswellia sacra* et de ceux de la résine de *Boswellia dalzielii*, très peu étudiée jusqu'à ce jour, par diverses méthodes (extraction acido-basique, par macération, par Soxhlet). On quantifiera ensuite ces acides dans les résines d'encens (par UHPLC-Orbitrap) et on testera alors les activités enzymatiques des extraits de *B. dalzielii* afin de mieux cerner son potentiel pour des applications médicinales et cosmétiques (vertus anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-tyrosinase). Suite à cela, nous nous intéresserons à l'identification et à la caractérisation (par distillations, chromatographie flash, GC-MS, GC-préparative et RMN) de composés semi-volatils, les cembranoïdes, de l'espèce d'encens *Boswellia papyrifera*, afin de compléter les connaissances scientifiques sur la composition de cette espèce moins connue que *B. sacra*.

Dans un second temps, on s'intéressera à l'analyse des composés plus volatils de ces résines, en étudiant d'abord deux odorants majeurs de l'encens *Boswellia sacra* : les acides olibaniques. On mettra ainsi au point une méthode d'analyse robuste et sensible qui permettra la quantification précise de ces acides odorants présents en très faibles proportions dans les huiles essentielles des espèces d'encens (GC-MS-SIDA). Pour continuer sur l'analyse de ces composés volatils odorants, on étendra l'étude aux composés

odorants des huiles essentielles de myrrhe *Commiphora myrrha* et de ciste *Cistus ladanifer*, à l'aide de différentes techniques d'extraction et d'identification (GC-MS, GC-Olfactométrie, GC-préparative, RMN).

Enfin, nous concluons ce travail et nous définissons les perspectives ouvertes par nos travaux.

CHAPITRE II

CARACTERISATION ET VALORISATION DE MATIERES PREMIERES
AROMATIQUES A INTERET MEDICINAL

I. CONTEXTE DES ÉTUDES

Outre les sucres contenus dans la partie gomme, les gommés-résines de myrrhe et d'encens contiennent également des métabolites secondaires volatils tels que des phénylpropanoïdes, des alcanes ou encore des mono- et sesquiterpénoïdes dans leur partie résine. En plus de cela, des composés semi-volatils et non-volatils de taille et poids moléculaire plus élevés tels que des phytostéroïdes, des diterpénoïdes ou des triterpénoïdes ont été identifiés dans les résines de ces matières premières.

Certains de ces composés ont montré de très fortes activités biologiques, par exemple, des guggulstéroïdes, des cembranoïdes et des triterpénoïdes de la myrrhe ont montré des activités anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et hypocholestérolémique [183,210–212]. Certains cembranoïdes d'encens sont responsables d'activités anti-inflammatoire, anti-protazoaire et neuroactive [147,148] et les acides boswelliques d'encens, ont montré des propriétés anti-inflammatoire, neuroprotective, anti-carcinogénique et cytotoxique [140,213–219]. Certains acides boswelliques sont exploités pour ces vertus, et entrent dans de nombreuses préparations pharmaceutiques telles que des crèmes cutanées pour la prévention de rides, pour le traitement de l'inflammation ou de tumeurs cancéreuses [220–222].

Dans ce chapitre, on s'intéressera dans un premier temps aux acides boswelliques en les quantifiant dans les résines de plusieurs espèces d'encens et en insistant sur la résine de l'encens *Boswellia dalzielii*, peu décrite, ainsi qu'en testant les activités anti-inflammatoire, anti-tyrosinase, anti-oxydante ou encore anti-élastase de ses extraits. Une partie expérimentale présentant une méthode d'obtention des acides boswelliques est présentée en annexe.

Dans un second temps, on s'intéressera aux diterpènes de la résine d'encens *Boswellia papyrifera*, en cherchant à identifier de nouveaux représentants de cette classe de composés.

II. COMPOSES TERPENIQUES NON VOLATILS A INTERET MEDICINAL : TRITERPENOÏDES DE *BOSWELLIA DALZIELII*

Partie basée sur la publication (soumise):

Phytochemical study of *Boswellia dalzielii* oleo-gum resin and evaluation of its biological properties.

Authors: Kimberley Massei¹, Thomas Michel¹, Girma Ilayas Obersat², Ahmed Al-Harrasi³, Nicolas Baldovini^{1,*}

¹ Institut de Chimie de Nice, Université Côte d'azur, 28 avenue Valrose, 06108 Nice, France

² Nature is Unique, Girma-Ilayas Obersat, Koepenicker Str. 16 10997 Berlin, Germany

³ Natural and Medical Sciences Research Center, University of Nizwa, Birkat-ul-Mouz 616, Nizwa, Sultanate of Oman

Abstract:

Boswellia dalzielii is a resin producing tree endemic to West and Central Africa, used by local populations for various medicinal purposes. In this study, *B. dalzielii* gum resin was analyzed by GC-MS and UHPLC-MS to identify and quantify volatile and non-volatile compounds. Its main volatile constituents were α -pinene (54.9%), followed by α -thujene (4.4%) and α -phellandren-8-ol (4.0%). Pentacyclic triterpenes such as β -boswellic acids and its derivatives were quantified by UHPLC-MS and their content was shown to reach around 22% of the gum resin. Since some of the volatile and non-volatile compounds identified in this work are known to possess biological effects, the bioactivities of *B. dalzielii* ethanolic extract, essential oil, as well as fractions of the oil and of the extract were evaluated, and some of these samples displayed interesting anti-inflammatory properties, as shown by the anti-oxidant, anti-ageing and skin-bleaching activities tested.

Keywords : *Boswellia dalzielii*, bioactivity, GC-MS, essential oil, characterization, LC-Orbitrap

II.1. Introduction

Frankincense is a gum resin of high economic importance obtained from trees of the *Boswellia* genus, mainly *B. carteri* (syn. *B. sacra*), *B. serrata*, *B. papyrifera* and *B. frereana*. Among other *Boswellia* species of lower commercial relevance, *B. dalzielii* is an interesting species which received attention only recently. This shrub is mainly found in Savanna region of West Africa, where it is known under the name of Hanu, Arrarabi or Basamu in north-western Nigeria, or as Soma in Adamawa State of Nigeria [223,224]. Various parts of this tree are used in African traditional medicine for their anti-diarrheal and anti-ulcer activity [224,225], as well as other gastrointestinal disorders [226]. To date, little information is available about the chemical composition of *B. dalzielii*, in comparison to the more classical *Boswellia* species. The first studies reported on the composition of the essential oil produced from its leaves [223,227], while the composition of the resin essential oil was described only in 2019, by DeCarlo et al. [228]. The oil was found to have several biological properties such as antimicrobial [39,116,229–231] or acetylcholinesterase inhibitory properties [217,232]. Concerning other potential applications, the anti-inflammatory properties of *B. dalzielii* were first reported by Duwiejua et al. in 1993, through *in vivo* experiments by physical measurement, but the precise anti-inflammatory mechanism was not investigated [233]. Later, other authors focusing on the medicinal use of this resin found that it has analgesic and anti-inflammatory properties, and even highlighted its anti-diarrhoea effect [234,235].

Studies on low- and non-volatile frankincense compounds began in the first half of the 20th century, with the isolation of pure boswellic acid followed by the synthesis of several derivatives [236,237], especially pentacyclic triterpenoids [53,132,134]. Several compounds (like boswellic and tirucallic acids) were shown to be responsible of some biological properties such as anti-inflammatory activities [140,142,238], antimicrobial effects [225] or even anti-cancer properties [134,211,239–241]. However, no study on the cosmetic potential of the resin has been published to date.

In this study, we first characterized the volatile and non-volatile constituents of *B. dalzielii* oleo-gum resin by GC-MS and UHPLC-MS, respectively, and compared its content of several triterpenic acids with other *Boswellia* species. Then, we investigated the biological potential of this material by performing anti-oxidant, anti-ageing, skin bleaching (or anti-melanoma), and anti-inflammatory tests.

II.2. Materials and methods

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated. β -boswellic acid (β -BA), and β -acetyl-boswellic acid (β -ABA) were obtained from Extrasynthese (Genay, France). 11-keto- β -boswellic acid (KBA), acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA) and 11-hydroxy-acetyl-boswellic acid (11-OH-ABA) were provided by the Natural and Medical Sciences Research Center, University of Nizwa, Oman. The samples were isolated and purified from an authenticated resin of *Boswellia sacra* tree, collected from Dhofar region, Oman.

A. Raw Material

Oleo-gum resin of *B. dalzielii* was collected in Jigawa State, Nigeria, Mar. 2020.

B. Plant extraction and hydro-distillation

The oleo-gum resins of *B. dalzielii*, *B. carterii* and *B. papyrifera* were crushed into fine powder and were then extracted by standard maceration or Soxhlet extraction on 10g of resin, using either

dichloromethane (DCM), diethyl ether (DE) or pure ethanol (EtOH) (extraction ratio 1/10 w/v) for 5h. The liquid macerates were filtered, and then evaporated to dryness to yield dry extracts of the resin. Alternatively, the grounded oleo-gum resin of *B. dalzielii* (100g) was hydro-distilled for 17h in a Clevenger apparatus to obtain the essential oil.

C. Fractionation of ethanolic extract and essential oil of *B. dalzielii* resin

The ethanolic extract (ca. 7g) obtained from the resin by maceration was fractionated over silica gel successively with four solvents of increasing polarities (petroleum ether (PE), DE, followed by AcOEt and finally EtOH). After evaporation, each eluate furnished a fraction with a respective mass of 0.06g (PE), 4g (DE) fraction, 2.4g (AcOEt) and 0.2g (EtOH).

The extract obtained from a large-scale ethanolic maceration (on 100g resin) was solubilized in DE and further extracted with 2M NaOH. Evaporation of the organic phases yielded the “neutral part” while the aqueous phase was acidified and then extracted (12M HCl; extraction with ED thrice) to provide the “DE-soluble acidic part”, and another extraction of the aqueous phase was eventually performed with chloroform/isopropanol 3:1 (v/v), yielding the “CHCl₃/iPrOH-soluble acidic part”.

The essential oil (ca. 1g) was fractionated over silica gel (63-200 μm, PE/DE elution gradient) leading to four fractions with corresponding masses of 252mg (PE), 391mg (PE/DE 7/3), 376mg (PE/DE 1/1) and 29mg (DE). α-phellandren-8-ol was isolated after fractionation of PE/DE 1/1 fraction of the oil over SiO₂-AgNO₃ (25μm, elution gradient : PE 9/1 → DE) (fractionation scheme in Annexe 1)

D. GC-MS and GC-FID analyses

The GC-MS and GC-FID analyses were performed on an Agilent GC 6890N Gas Chromatograph coupled to an Agilent 5973N mass selective detector working in electron impact mode (70 eV). The analyses were performed on an HP-1 capillary column (50 m × 0.2 mm i.d., 0.33 μm film thickness, Agilent Technologies). The carrier gas was helium at a flow rate of 0.8mL/min. The oven temperature was programmed from 50 to 280°C at 3°C/min and held isothermal for 15 min. Samples (1μL) were injected in split mode (25:1) or splitless for FID analyses, and the injector was set at a temperature of 250°C. The temperatures of the ion source and transfer line were 230°C and 280°C, respectively. GC-MS analyses were also carried out on a 6890N GC - 5973 MSD (Agilent) equipped with a fused silica capillary column HP-INNOWAX (50 m × 0.2 mm i.d., film thickness: 0.4 μm; Agilent Technologies) and operating in the same conditions as above except for the following parameters: the oven temperature was programmed from 50 to 220°C at 3°C/min and held isothermal for 20 min, and the injector (split mode ratio 20:1) and transfer line temperatures were 240°C and 250°C, respectively. Acquisition was performed in scan mode (35–350 a.m.u.). The essential oil and its fractions were analyzed as 10% solutions in toluene. The constituents were identified by comparison of their mass spectra and LRI with those of pure compounds registered in commercial libraries and literature data, and with a laboratory-made database built from authentic compounds. The comparison was made with the help of SearchReview Software (N. Waleson, Leoson, 2021).

E. NMR analyses

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400 (400MHz) spectrometer in CDCl₃.

F. UHPLC-Orbitrap

The UHPLC-MS/MS analyses were performed on a Vanquish UHPLC system equipped with a binary pump, a column compartment and a split sampler coupled with a Q Exactive Focus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) using an electrospray ionization source (ESI). Data processing was achieved by using Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

The chromatographic separation was performed using an analytical reversed-phase UHPLC column (Hypersil Gold Basic-C18, 1.9 μm , 150 \times 2.1 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The flow rate was set to 0.2 mL/min and the injection volume was 5 μL . The mobile phase consisted of eluent A, methanol/water (80/20, v/v) acidified with 0.2% acetic acid, and eluent B, methanol acidified with 0.2% acetic acid. Initial conditions were 60% eluent A and 40% eluent B followed by a linear gradient to 50% eluent B over 2 min, then 70% eluent B until 15 min, and then 100% eluent B until 18 min. Finally, isocratic conditions were applied with 100% eluent B until 25 min. In order to stabilize the chromatographic system, the column was kept at a temperature of 25°C.

Two windows of ion scan ranges of MS analyses were defined regarding the retention times of compounds elution. Parent ions (molecular ions) of standards with highly accurate mass were selected as the highest intense ions for MS/MS fragmentation. A window from 0min to 10min for the scan of specific parent ions of KBA, AKBA, 11-OH-ABA, and another window for β -ABA and β -BA (from 10 to 32min) were defined. Precursor ions selected have a corresponding m/z of 469.33233, 511.3429, 513.35855, 497.36363, 455.35307, for KBA, AKBA, 11-OH-ABA, β -ABA and β -BA, respectively, and all their product ions were quantified after MS/MS fragmentation (TIC) in Orbitrap mass analyzer. The ion source was heated to 350°C and the ion spray voltage was set to -2700 V. MS/MS analysis was performed in the negative mode. Collision energy was optimized to -15 V for β -ABA, AKBA and 11-OH-ABA, and to -39 V and -45 V for KBA and β -BA, respectively. The resolution was chosen as 17500, and the dwell time (ion time) was automatically adjusted, when a maximum number of ions entering to the orbitrap was around 1×10^6 ions. This method of quantification enables us to overcome accuracy problems and matrix effects [242,243].

Quantification of compounds was done using the standard addition method, in *B. dalzielii*, but also in *B. carterii* and *B. papyrifera* for comparison of their relative content in pentacyclic triterpenic acids (PTA). Samples were dissolved in methanol or EtOH/MeOH if necessary, and analyzed with a known spiked amount of standard, according to standard addition method. To estimate the analyte concentrations in oleogum resins, the results of the extract analysis were corrected by extraction yields percentages obtained for EtOH extracts of resins. The standard was spiked at two different concentrations at least, and with a variable total volume of sample analyzed. To determine the concentration in our samples, the following formula was used and plotted, according to Bader et al. [244] :

$$R_n = k \left[\frac{V_x C_x}{V_x + NV_s} + \frac{NV_s C_s}{V_x + NV_s} \right] \quad \text{then,} \quad C_x = \frac{bV_s C_s}{mV_x}$$

Where C_x is the stock concentration of unknown ; V_x is the fixed unit volume of unknown

C_s is the stock concentration of standard ; V_s is the fixed unit volume of standard

N corresponds to the running integer 0,1,2, etc.

k is a constant of proportionality

b is the intercept of the straight line

m is the slope of the straight line

Standard addition method enables us to overcome accuracy problems and matrix effects. The linearity and intraday precision of triplicate were checked to ensure a reliable quantification, and concentrations of spiked standards and of samples for analysis were calculated (voir annexe1).

Other qualitative analysis of fractions and standards were carried out with the same operating conditions but without MS/MS fragmentation. Such analyses were performed in switch mode (positive and negative) and the TIC was analyzed.

G. Bioassays

G.1. Sample preparation

Samples (extracts, fractions, standards and controls) were prepared at a concentration of 3.4 mg/mL in dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain final concentration of extract per well of 100 µg/mL. Bioassays were performed in triplicate for each sample. Negative control was made by replacing sample by DMSO in the plate.

G.2. Instrumentation

An automated pipetting system Eppendorf epMotion® 5075 was used to perform the bioassays, in untreated 96-well plates (Thermo Nunc, Villebon-sur-Yvette, France). Absorbance values were measured with a Spectramax Plus 384 microplate reader (Molecular Devices, Wokingham, UK). The SoftMaxPro software (Molecular devices, Wokingham, UK) was used to acquire the data. The results for enzymatic inhibition and DPPH assays were calculated as :

$$I(\%) = \frac{\text{average OD}_{\text{control}} - \text{corrected OD}_{\text{sample}}}{\text{average OD}_{\text{control}}} \times 100$$

I%: inhibition percentage (%)

OD: optical density measured

corrected OD_{sample}: measured OD of sample – measured OD before substrate addition (blank)

G.3. DPPH Radical Scavenging Assay

The DPPH radical was used to measure the anti-scavenging activity of essential oils, extracts and fractions, based on the protocol for antioxidant activity evaluation from Brand-Williams et al. (1995) [245], modified by Plainfossé et al. [246], and with some slight modifications as following : 150 µL of an EtOH/acetate buffer (1:1 (v/v), 0.1M, pH = 5.4) were distributed in each well. Then, 7.5 µL of the samples evaluated were added, for a final concentration of 100 µg/mL. As positive control, a trolox solution was prepared in DMSO (3607.8 µM) and added instead of the sample. Two measures of OD were taken at 517 nm, one before the addition of DPPH radical, and one 30 min after the addition of DPPH radical in each well, after incubation in the dark at room temperature (final concentration :150 µM of a DPPH solution).

G.4. Lipoxigenase Assay

The anti-inflammatory activity was measured for samples according to the protocol of Granica et al. [247], slightly modified as following: the enzyme was added in a phosphate buffer (150 μ L at 686.66 U/mL, in 50 mM buffer pH = 8) and was distributed in each well (final concentration 400 U/mL). Then, 7.5 μ L of the extracts tested or positive control compound (resveratrol) were added. After 10 min plate incubation under agitation and in darkness, 100 μ L of a solution of linoleic acid prepared in phosphate buffer (final concentration 0.388 mM per well) were distributed in each well. After a short incubation of 2 min under darkness, OD was measured at 235 nm and, after another incubation of 50 min, a second OD measurement was taken OD at 235 nm.

G.5. Tyrosinase Assays

Anti-tyrosinase assay allows the evaluation of anti-bleaching and anti-melanoma activity by an in-vitro test according to several previously published protocols [248–250] with some modifications : The enzyme was added in a phosphate buffer (150 μ L at 85.83 U/mL, in 100 mM pH = 6.8) and was distributed in each well (final concentration 50 U/mL). Then, 7.5 μ L of the extracts tested or positive control standard (kojic acid) were added. After 20 min plate incubation under agitation at RT, a first OD measurement was performed at 480 nm, and then, 100 μ L of a solution of L-DOPA (diphenolic activity assay) prepared in 1 mM phosphate buffer (final concentration 0.388 mM per well) were distributed in each well. After 20 min incubation at RT, OD was measured at 480 nm a last time.

G.6. Elastase Assay

The evaluation of anti-elastase activity for cosmetic application was evaluated according to the protocol published by Canell et al. [251] that was optimized by several authors [83,252] : Elastase enzyme from porcine pancreas was added in a Tris buffer (150 μ L at 0.171 U/mL, in 50 mM pH = 8) and was distributed in each well (final concentration 0.1 U/mL). Then, 7.5 μ L of the extracts tested or positive control standard quercetin was added. After 2 min agitation, and 20 min plate incubation at RT, a first OD measurement was performed at 410 nm, and then, 100 μ L of a solution of AAA PnA (Succinyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Alanine p-Nitroanilide) prepared in Tris buffer (final concentration 0.8 mM per well) were distributed in each well. After 2 min agitation, and 40 min incubation at RT, OD was again measured at 410 nm.

H. Statistical analyses

Experiments were assessed in triplicate and the data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) or standard deviation (S.D.), as indicated. Statistical analysis was performed using XLStats software (Addinsoft, Paris, France). Sample groups were compared to the control group by Kruskal-Wallis one-way analysis of variance and the Dunn's test for non-parametric data.

II.3. Results and discussion

A. Optimization of extraction parameters

Several authors already investigated the best technique and/or the best solvent (or solvent mixture) for the extraction of pentacyclic triterpenic acids (PTA). Here, we aimed at extracting as much as possible PTA

such as boswellic acids, along with other compounds. Solvents reported to extract exhaustively pentacyclic triterpenes were selected. Indeed, some authors such as Goulas et al. [133] compared the different ways of extraction of triterpenic acids (PTA) from different raw materials. They found that the use of methanol (MeOH), ethanol, or a mixture of both solvents was efficient to extract exhaustively PTA. Furthermore, successive extractions of two species of frankincense resin were tested, at a ratio 1/10 (w/v) [132] and the number of extraction cycles was evaluated in order to get an exhaustive extraction of PTA from the resin. The maximal extraction efficiency of PTA was determined to be reached with 3 extractions of 45 min [134].

Soxhlet and maceration are the two different techniques of extraction tested here, in order to compare the global extraction yield for the same solvent. Soxhlet extraction was performed under reflux during 5h. The best extraction yield was obtained for DCM, with 78% and 85% extraction yield for Soxhlet and maceration extractions, respectively. For EtOH or DE solvent, the yield for both techniques of extraction was similar, whatever the solvent used. To preserve all compounds and avoid the thermal degradation of less stable compounds, the maceration technique was chosen rather than Soxhlet extraction. (annexe 1)

Those quite similar extraction yields lead us to avoid the use of DCM and DE regarding environmental concerns, and to prefer the use of EtOH than MeOH for health concerns, and because bioactive compounds should be extracted with the greenest solvent possible.

Thus, we decided to perform a 2h maceration at a ratio 1/10 (w/v) under stirring at 25°C and, after Buchner filtration, a second extraction of the resin with pure EtOH solvent, under the same conditions, was performed during 3h more for a total extraction of 5h.

B. GC-MS and GC-FID analyses

The essential oil of *B. dalzielii* was analyzed by GC-MS and quantified by GC-FID. Results are presented in **Table 1** : Constituents of the essential oil of *Boswellia dalzielii*. A total of 78 compounds were found in the essential oil of the resin. This oil is mainly composed of monoterpenes, accounting for 70.6% of total oil, with 20 compounds. However, the highest number of components was found in the family of oxygenated monoterpenoids, with 32 compounds representing 18.8% of the oil. Sesquiterpenoids and diterpenoids were present in low amount (5.4% of the remaining components of the oil), mainly composed of oxygenated diterpenoids such as serratol, nepthenol and incensole. Major compounds of the oil were identified as α -pinene (54.9 %), thujene (4.4 %) and α -phellandren-8-ol (4.0 %). As for *B. dalzielii*, *B. sacra* and *B. rivae* resin essential oils are also characterized by a high content in α -pinene, while *B. serrata*, *B. elongata*, *B. ameero* and *B. frereana* are richer in thujene than in α -pinene [125,170,253]. *B. papyrifera* possesses high amounts of diterpenoids and esters, and *B. serrata* contains phenylpropanoids such as methyl eugenol or estragol, that are compounds typical of these species. The high number of monoterpenoids in *B. dalzielii* oil, even more than in *B. frereana*, makes *B. dalzielii* oil easily distinguishable from other frankincense oils.

Table 1 : Constituents of the essential oil of *Boswellia dalzielii*.

RI _{HP1}	RI _{HP1} Litt. ^a	RI _{Wax} ^b	RI _{Wax} Litt.	Identification	% ^e
928	926	1088	-	α-thujene	4.4
939	935	1038	1041	α-pinene ^c	54.9
947	945	1097	1070	α-fenchene	tr
949	947	1102	1114	Camphene	0.8
952	957	1151	1135	dehydrosabinene	0.6
970	968	1145	1156	Sabinene	1.2
975	973	1136	1141	β-pinene	1.9
984	980	1216	1193	2,3-dehydro-1,8-cineole	tr
986	983	1181	1168	Myrcene	1.1
988	-	1241	-	unknown ^f	0.3
995	983	1441	1424	o-cresyl methyl ether	0.4
1000	1002	1222	1216	1,5,8-p-menthatriene	0.2
1002	999	1189	1168	α-phellandrene ^c	0.1
1009	1007	1172	1147	β-3-carene ^c	tr
1013	1111	1204	1186	α-terpinene	0.2
1016	1015	1298	1285	p-cymene	2.0
1026	1024	1224	1198	limonene ^c	2.0
-	-	1235	1230	1,8-cineole	0.7
1030	1029	1252	1259	cis-β-ocimene	0.5
1040	1038	1252	1259	trans-β-ocimene	0.2
1053	1050	1270	1245	γ-terpinene	0.4
1065	1058	1434	1444	sabinene hydrate	tr
1068	1061	1353	-	pinol	0.2
1078	1074	1468	1438	p-cymenene	0.1
1083	1079	1307	Std	α-terpinolene ^c	0.1
1089	1086	1562	1545	linalool	0.4
1091	1101	1442	1429	perillene	0.1
1095	1094	1652	1643	dehydrosabinaketone	tr
-	-	1411	1384	α-pinene epoxide	tr
-	-	1422	1425	acetic acid	tr
1101	1098	1478	1440	thujone (Z)	tr
1110	1107	1527	1496	campholenal	0.5
1114	1107	1629	1601	nopinone	tr
1122	1116	1395	1377	allo-ocimene	tr
1131	1126	1692	1661	pinocarveol*	2.2
1132	1134	1687	1660	cis-verbenol*	0.5
1137	1126	1695	1680	trans-verbenol*	1.3
1138	1134	1692	-	unknown ^g	2.7
1144	1144	1592	1576	trans-pinocamphone	0.1
1153	1149	1756	1738	α-phellandren-8-ol ^{d,*}	4.0
1157	1148	1731	1720	sabinol*	0.3
1158	1153	1736	1723	borneol*	0.4
1162	1161	1823	1808	p-methyl-acetophenone	tr
1162	1157	1722	1715	kryptone	0.1
1168	1165	1633	1601	terpinen-4-ol ^c	1.8
1174	1182	1820	-	cis-pinocarveol	tr
1177	1171	1676	1691	myrtenal	0.4
1180	1176	1726	1712	α-terpineol*	0.9
1189	1182	1827	1790	myrtenol ^{c*}	0.4
1190	1184	1762	1735	verbenone*	1.5

1205	1201	1865	1836	trans-carveol ^{c*}	0.5
1217	1213	1895	1854	cis-carveol ^{c*}	tr
1219	1215	1831	1804	cuminaldehyde	tr
1222	1218	1781	1734	carvone ^c	tr
1227	1233	1775	1748	piperitone	tr
1229	1229	1834	1811	2,5-dimethoxytoluene	tr
1246	1235	1889	1864	3,5-dimethoxytoluene	0.6
1256	1250	1771	1759	phellandral	tr
1272	1270	2140	2130	cuminol	tr
1275	1270	1615	1597	bornyl acetate	0.6
1294	1298	2243	2225	carvacrol	tr
1381	1375	1523	1519	copaene	0.1
1520	1514	1792	1785	Δ -cadinene	tr
1582	1576	2042	2042	caryophyllene oxide	tr
-	-	2080	2084	octanoic acid	tr
1969	1984	2300	-	cembrene A	0.9
2012	-	2388	-	cembrene C	tr
2144	2164	2419	-	nepthenol	1.0
2156	2174	2712	-	incensole	0.8
2162	2179	2222	-	serratol	2.6
-	-	2345	-	α -campholenic acid	0.8

^a Linear Retention Indices from literature. ^b Linear Retention Indices determined on HP-INNOWAX column. ^c Confirmation of the identification by injection standard on HP-1 column. ^d Confirmation of the identification by NMR. ^e Relative area percentages of peaks were determined by GC-FID analyses. ^f Mass spectrum similar to 1,3,8-p-menthatriene. ^g Mass spectrum similar to α -phellandren-8-ol. tr : trace compounds with a relative area inferior to 0.1%. * compounds found in PE/DE 1-1 fraction of the oil.

Moreover, some oxygenated constituents such as eucalyptol or acidic compounds were identified following analysis on polar column. Among the large number of oxygenated compounds found in the oil, different classes of compounds were seen such as aldehydes, and ketones, however, the largest number of oxygenated compounds found in the oil are alcohols, whose most abundant are α -phellandren-8-ol isomers, serratol, verbenol and terpinen-4-ol.

In addition to GC-MS analyses, the identification of α -phellandren-8-ol was confirmed by NMR (supp. Data. Table S2), on the basis of the results published by Russell et al. [254]. According to the MS spectra, several other isomers of this compound were probably present in the oil, but could not be characterized due to their low amount.

C. UHPLC-HRMS

Five pentacyclic triterpenic acids commonly found in *Boswellia* species and known for their biological activities were quantified using standard addition method, by UHPLC-HRMS/MS analyses in *Boswellia dalzielii*, as well as in *B. carterii* and *B. papyrifera* for comparison of their relative content in PTA. The choice of the reverse phase and mobile phase enable the separation of PTA isomers from our resin extracts. The content of specific PTA quantified varied from 19.7 % in *B. papyrifera* resin to 25.2 % in *B. carterii* resin. Results are presented in **Table 2**.

Table 2 : Concentrations of pentacyclic triterpenic acids in *Boswellia* oleogum resins, and reported concentrations found in the literature for *B. dalzielii* resin.

Species	Samples Extraction yield \pm S.D. (%)	Concentration of PTA (g/100g resin)					Ref.
		KBA	AKBA	β -ABA	β -BA	11-OH-ABA	
<i>B. papyrifera</i>	69.7 \pm 0.1 (n=2)	1.26	7.59	4.07	3.45	3.29	
<i>B. carterii</i>	71.5 \pm 0.1 (n=2)	1.45	2.85	N.D.	1.68	1.65	
<i>B. dalzielii</i>	69.8 \pm 0.2 (n=3)	4.04	8.78	5.53	0.52	3.25	
<i>B. dalzielii</i>	71.5 \pm 2.7 (n=3)	1.18	6.47	3.25	1.82	N.D.	[134]
<i>B. carterii</i>	61.0 \pm 7.4 (n=5)	0.15	0.99	3.13	5.28	N.D.	[134]
<i>B. carterii</i>	N.D.	0.19	6.90	3.99	3.05	N.D.	[53]
<i>B. carterii</i>	N.D.	0.73	3.82	0.12	1.73	N.D.	[53]
<i>B. sacra</i>	N.D.	2.13	4.24	0.596	11.2	N.D.	[132]

N.D.: Non Determined. The three first species in this table are those quantified in this work.

Several authors already found that the most common frankincense species, *B. carterii*, contained around 10-30% PTA. Indeed, Mannino et al. claimed that a content percentage of boswellic acids (BAs) higher or equal to 70% results from a wrong quantitative determination.

Concerning *B. carterii* (= syn *B. sacra*) Mannino et al. showed that α -BA and β -BA represented around 75% of the total BAs amount quantified in *B. sacra* resin (22% of the resin), with β -BA accounting for 11.2 % of the resin [132], followed by AKBA and KBA. In another work, Schmiech et al. also found that α -BA and β -BA accounted for 75% of total PTA quantified in the resin (7.6% of the resin), followed by AKBA and KBA [134]. In a previous work, α -BA and β -BA were also shown to represent a large part of total quantified BAs in *B. sacra* (from costal region), however, containing a higher amount of AKBA reaching 3.8% of the resin.

In a previous work, by determining the content of BAs in *B. sacra* resin from a mountainous region, it was found that AKBA was the major compound, representing almost 7% of the resin, followed by both α - and β -BA isomers. In addition to that, a high difference in content about 33 times more β -ABA in *B. sacra* (mountainous resin) than in *B. sacra* costal resin was found. Variations were also seen in our results here, with the major compound β -ABA representing more than 17% of the resin. Thus, non-negligible variation of PTA amount in the resin results from the intra-genetic variability within plants of the same species, as well as from environmental factors such as temperature, climate, soil composition and others. The use of different techniques of quantification can also lead to variations of PTA amounts. For instance, several works on the quantification of PTA were assessed through an external quantification with PTA themselves as standards [131,132], and another quantification work was carried out with one structurally similar standard to PTA [134].

In our study, by using the standard addition method in PRM mode, we only quantified the β - isomers form of boswellic acids. We found an amount of β -BA accounting for 1.68% of our *B. carterii* resin, an average similar result of quantification compared to β -BA amount found in other works, where this compounds represents from 1.7 % to 5.28 % of the resin [53,131,134]. Concerning AKBA, which reach about 2.9 % of our resin (*B. carterii*), a similar amount of this compound was found to represent around 1% to 4.7% of the resin [53,131,132,134]. However, while authors found about 3% amount of β -ABA, we found about ten times more of this compound in our resin for *B. sacra*, compared to those quantified by Mannino et al., Büchele et al, and compared to *B. sacra* Shaabi. Schmiech et al. were the first and only study to quantify

PTA in *B. dalzielii*. We obtained a higher amount of all PTA quantified our resin, but a similar order of magnitude was observed for this quantification in *B. dalzielii*.

A high percentage of BAs with a ketone group, KBA and AKBA, is found among those species cited here, and those compounds are known to be the most bioactive for medicinal activities such as anti-cancer activities by inhibiting the growth of cancerous cells, or growth factors inducing angiogenesis, or even having apoptotic and anti-proliferative effects on cancer cells [214,239,255]. Furthermore, AKBA and KBA are known to be highly active on NF- κ B signaling, which is a factor with an important role in cancer cell and in inflammation in general. AKBA also prevents inflammation by acting on LPS-induced inflammation and by reducing oxidative stress [213,256,257]. Moreover, as already mentioned by Schmiech et al. [134], our results showed that *B. dalzielii* had the highest content of those acetylated BAs with a ketone group, AKBA and KBA, compared to other *Boswellia* species studied here, giving a high added value to this resin for its medicinal potential.

D. Bioassays

Several compounds coming from the natural resin exudate of *B. dalzielii* were tested for their anti-oxidant benefits in order to inhibit lipid oxidation, that accentuates skin senescence, but also affecting our global health due to the production of, among others, oxidative stress affecting our cells. Lipoxigenase inhibition assay was also performed in order to avoid symptoms due to inflammatory process, disturbing the normal function of our body, and generating stress, often at the origin of cancers or skin injuries. Tyrosinase inhibition assay was also evaluated to prevent the appearance of melanomas and to treat hyperpigmentation problems, but also for aesthetic purposes such as scars or freckles treatment. Facing the aging of the population, there is a demand to address aesthetic problems, such as treatments to limit skin senescence. Thus, compounds inhibiting elastase activity, naturally occurring in plants, are also requested by people. Thus, anti-elastase activity was also evaluated here.

D.1. Anti-scavenging activity

Antioxidants are able to prevent from abnormal physiological function by regulating free radical species content in human cells, causing oxidative stress [75,76]. Results of anti-oxidant assay are presented in **Figure 14**. A weak antioxidant activity was found for *B. dalzielii* resin extract, fractions and essential oil. The CHCl₃-iPrOH soluble part was the most active among all fractions of the resin macerate, and it reached about almost 13% inhibition of the DPPH radical only. The oleo-gum resin composition of *Boswellia* species is known to contain around 5-10% essential oil (containing compounds of low volatility, i.e. mono-, sesqui- and some diterpenoids), from 65 to 85% of resin, with heavier terpenoids, and the remaining part, the gum, mainly composed of sugars such as dicarboxylic acids, hexoses and polysaccharides [123,258]. Gum constituents, present in the ethanolic extract obtained, were already shown to have potential antioxidant and/or immuno-stimulatory activities [258,259]. However, the anti-oxidant power of this fraction is weak, and the DE-soluble part even lower, with 3.4% inhibition observed and no inhibition for the essential oil. The whole ethanolic macerate was also shown to have a weak antioxidant potential, with only 6.6% anti-scavenging activity, attesting for the overall weak antioxidant activity of the oleo-gum resin.

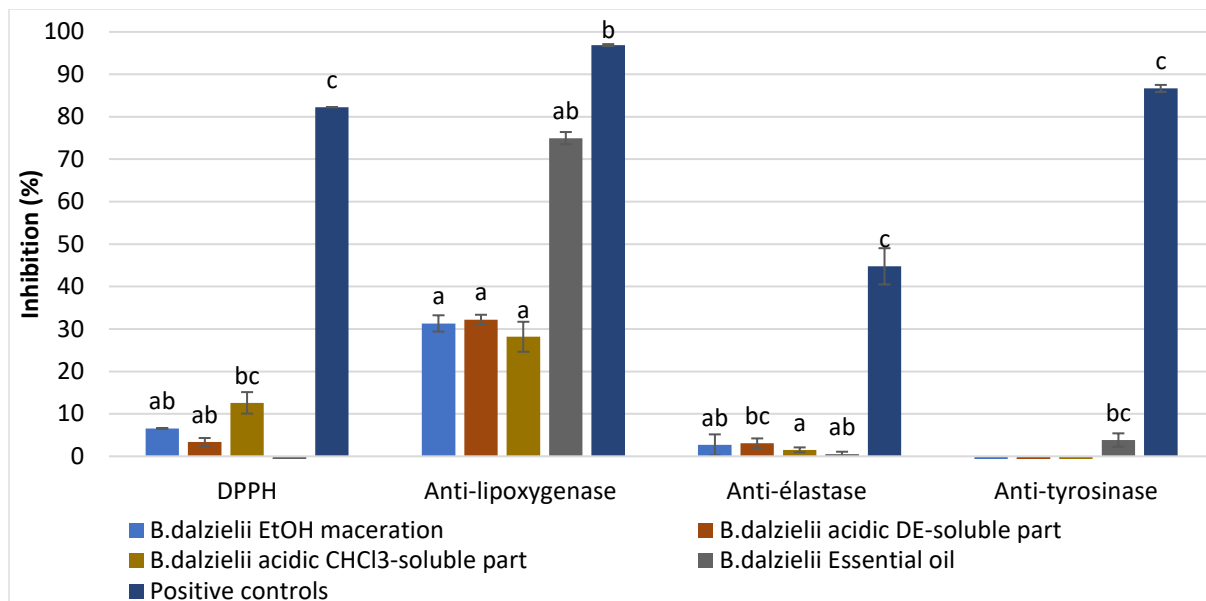


Figure 14 : Inhibitory activities of fractions or extracts of *B. dalzielii* on DPPH radical, or on elastase, lipoxygenase or tyrosinase enzymes.

Results are presented as mean values \pm SEM (error bars); letters (a-c) indicate significant differences between values in Kruskal-Wallis followed by Dunn's test with $p < 0.1$ for elastase inhibitory activity and with $p < 0.05$ for all other bioactivity tests. Means with no letter in common are significantly different from each other.

D.2. Anti-inflammatory activity

Anti-inflammatory compounds such as leukotrienes are produced to eliminate the initial cause of cell injury, however, their overproduction is a major cause of inflammation [260]. The use of lipoxygenase inhibitors allows to act directly on the inflammatory mechanism and to reduce the formation of leukotrienes responsible for the inflammation of the skin or other tissues.

The ethanolic extract of the resin of *B. dalzielii* possesses an anti-inflammatory activity, with $31.30 \pm 1.92\%$ inhibition of lipoxygenase enzyme, although this activity is lower than the one exerted by the oil, with $74.96 \pm 1.44\%$. We can clearly see a moderate activity, around 30% lipoxygenase inhibition by other fractions such as DE- or CHCl₃-soluble parts of EtOH macerate, and by alcoholic extract of the resin itself. (**Figure 14**)

With these results, it was decided to perform another lipoxygenase inhibition assay on the raw ethanolic macerate that was fractionated in another way, without preliminary separation of neutral from acidic constituents of the resin extract. Results are presented in **Figure 15**. Ethanolic macerate and its apolar fractions such as DE or AcOEt fractions were the most active, however, compared to the control, their activity were lower with around 38-48% of lipoxygenase inhibition. A weak enzyme inhibition was observed for the most EtOH fraction, suggesting that apolar compounds are mostly able to inhibit lipoxidase activity and compared to DE and AcOEt fractions, the ethanolic fraction of EtOH macerate is significantly less potent for fighting against inflammation.

The biological activity on the lipoxygenase enzyme involved in inflammation was already investigated by many authors since this resin was used to cure from some diseases. Ursolic acid and oleanolic acid, known to be present in *Boswellia* species, were both found to be as active as the whole extract of the plant

investigated, meaning that they were responsible for the anti-inflammatory activity. Other authors showed the anti-inflammatory activity of boswellic acids and showed that the most pronounced activity was due to AKBA [262,263]. Moreover, the aqueous extracts of the resin of several *Boswellia* species was investigated for anti-inflammatory activity, along with pure compounds such as masumbinoic acids and showed a great activity [233].

Triterpenic acids contained in our resin possess five hydrocarbonated rings, highly lipophilic, and functional groups such as hydroxyl, acetate or carboxylic acids groups decreasing the global hydrophobicity of the compound. These compounds were extracted with ethanol and, after fractionation, were seen by UHPLC-MS/MS analyses in DE fraction, where those acids almost constitute the entire fraction. A few amounts of these PTA were also seen in AcOEt fraction, along with other compounds, and some traces were also found in EtOH fraction of EtOH extract of the resin (Annexe 1).

Globally, several other PTA such as lupeolic acid, α -boswellic acid or 3-O-Acetyl- α -boswellic acid were identified according to their mass spectra, and compared to those of the literature [132]. Thus, the strong anti-inflammatory activity of DE fraction of the alcoholic extract could be due to these triterpenic acids, already known for their bioactive nature. Then, the lower activity of AcOEt and even lower for EtOH fraction shows a clear correlation between the inhibitory activity observed and the relative content of PTA, with a decrease in lipoxygenase inhibition as the content of PTA decreases. As said previously, AKBA and KBA have a key role in reducing inflammation process, and the highest amount of those PTA was seen in *B. dalzielii* resin [134], and especially in ED and AcOEt fractions of EtOH extract (Annexe 1). A correlation between the relative content of those PTA and the lipoxygenase inhibition seems to be seen here.

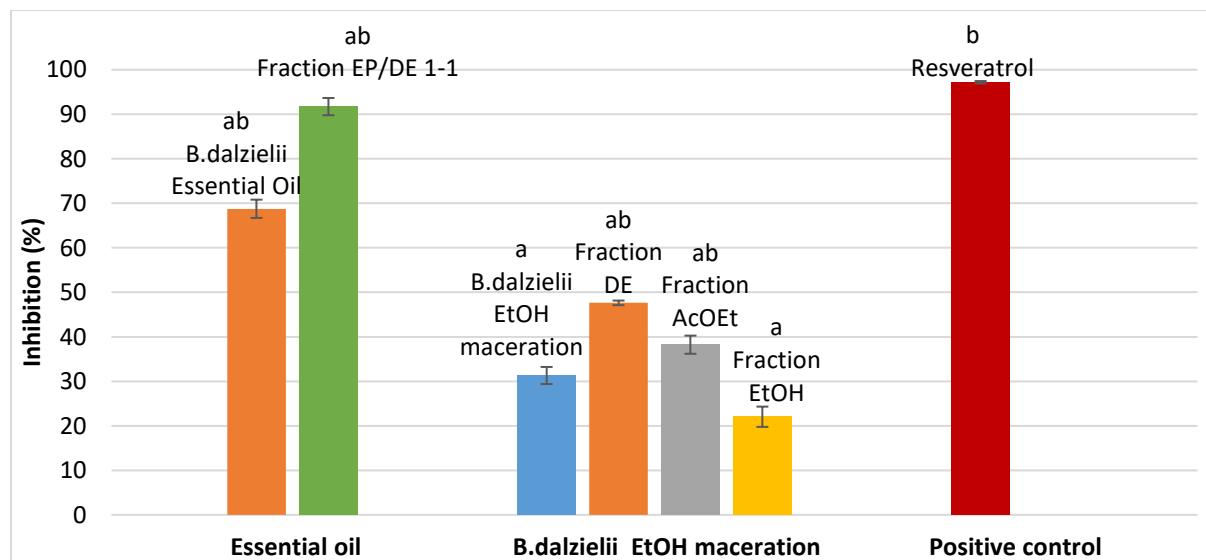


Figure 15 : Anti-inflammatory activity of fractions or extracts of *B. dalzielii*. Results are presented as mean values \pm SEM (error bars); letters (a-c) indicate significant differences between values in Kruskal-Wallis followed by Dunn’s test with Bonferroni correction ($p < 0.0024$).

The assay performed on the EtOH extract and its fractions reveals a considerable difference of inhibitory potential compared to the positive control, meaning that the ethanolic extract and its fractions have a

lower anti-inflammatory activity compared to the control. Despite this lower activity, the extract and its fractions still exert more than 30% inhibitory activity, with almost 50% inhibition activity reached for DE fraction, showing a high potential for anti-inflammatory activity (**Figure 15**).

Moreover, in this assay, a weak difference between the oil and its fraction PE/DE 1-1 and the positive control was observed, with $91.72 \pm 1.44\%$ enzyme inhibition activity for the oil. This difference between the oil fraction and the control was not significantly different, showing that this fraction was highly active, with $97.20 \pm 0.26\%$ of inhibition by resveratrol. The analysis of this oil fraction highlighted major constituents, expressed in % of MS, such as α -phellandren-8-ol (39.3 %), *trans*- and *cis*-verbenol (16.4 and 7.5 %, respectively), verbenone (11.0 %), myrtenol (7.0 %), *trans*- and *cis*-carveol (3.8 and 0.5 %, respectively), pinocarveol (3.1 %), thymol (2.7 %), borneol (1.7 %), and α -terpineol (1.3 %), accounting for more than 92% of the fraction.

Thymol was already seen to be a potent anti-inflammatory agent, with an IC₅₀ for lipoxygenase inhibition 15 times lower than nordihydroguaiaretic acid, used as a positive control [264]. The anti-inflammatory activity of borneol and carveol was also investigated and showed a general decrease of the amount of level of several inflammatory factors such as nitric oxide, interleukine 6 or inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor α , and borneol was shown to possess anti-inflammatory activity by in vitro test LPS-induced RAW 264.7 macrophages [265,266]. Other compounds such as *trans*-pinocarveol, myrtenol and α -terpineol were also seen to be involved in inflammation, with cytokine blood concentration reduction, or inhibition of neutrophil influx [267–269]. Some compounds of this fraction such as carveol, or terpineol, are also known to possess anti-oxidant activities and thus, potential reduction or control of inflammation because antioxidants compounds are able to protect cells from reactive oxygen species and other free radicals, thus, preventing inflammatory process [270]. Thus, these *B. dalzielii* essential oil compounds could be responsible of the global anti-inflammatory activity of this oil, but further analyses are needed to test the activity of other compounds of this fraction.

D.3. Cosmetic bioactivities

The anti-tyrosinase and anti-elastase assays aim to screen compounds for their ability to inhibit tyrosinase and elastase enzymes, respectively, in order to ensure a normal maintenance of the skin. The highest anti-elastase activity was found for the DE-soluble fraction of EtOH extract, with only about 3.0 % inhibition activity. Even weaker or even non-existent inhibitory activities were noticed for tyrosinase assay. Thus, no tyrosinase nor anti-elastase activities were found for *B. dalzielii* resin extract, fractions and essential oil.

II.4. Conclusion

The use of *B. dalzielii*, growing in arid areas of Africa, was mostly limited to local populations around, compared to other resin-bearing species such as *B. carterii* (frankincense) or *Commiphora myrrha*. A few literatures is available about the composition and the amount of compounds of this species, and, this study completes the information about the resin of this shrub. Here, we showed that the EtOH extract of this oleo-gum resin as well as its essential oil exerted a strong anti-inflammatory activity, highlighting the valuable potential of the resin and its essential oil for medicinal purposes. Moreover, this species possesses the most bioactive pentacyclic tripterpenic acids in higher amounts compared to other *Boswellia* species, making this resin a material of interest. Finally, this study gave new insights into the discovery of frankincense species left behind, such as *B. dalzielii*, and this study contributes to the overall knowledge about the phyto-composition of *B. dalzielii*, and of *Boswellia* species.

III. COMPOSES TERPENIQUES SEMI-VOLATILS A INTERET MEDICINAL : DITERPENES DE *BOSWELLIA POPYRIFERA*

Partie basée sur la publication (en cours de préparation) :

Cembrane diterpenes from *Boswellia papyrifera*

Authors: Kimberley Massei¹, Nicolas Baldovini¹

¹ Institut de Chimie de Nice, Université Côte d'Azur, CNRS, UMR 7272, Parc Valrose, 06108 Nice (France)

Abstract:

The dichloromethane extract of *B. papyrifera* was fractionated by vacuum distillation and the volatile fraction obtained was analyzed by GC-MS and further fractionated by flash chromatography and preparative GC to isolate some of its unknown constituents. A total of 22 compounds were identified, among which 10 represented 84% of the GC profile. Moreover, we managed to isolate 7 compounds through successive steps of fractionation, that were analyzed by NMR spectroscopy.

Keywords: volatile compounds; frankincense; *Boswellia papyrifera*; diterpenes; cembranoids

III.1. Introduction

Boswellia papyrifera is mainly found in North Eastern Africa, in countries such as Ethiopia, Eritrea, Sudan but also in Cameroon and Mali [119,134,139]. As other *Boswellia* species such as *B. sacra*, *B. serrata*, or *B. dalzielii*, it also produces an oleo-gum resin, which contains around 1-10% oil, 60-70% resin and 20-30% gum. [115,271]

Also called Tigray-type frankincense, this valuable exudate was used to treat amenorrhea, diarrhea, and respiratory disorders. [271] The acidic part of the resin contains triterpenic acids, known for their anti-inflammatory, protective, and anti-cancer activities [140,213,215,272,273]. Incensole acetate contained in *B. papyrifera* resin was highlighted for its anti-inflammatory activity, some stilbenes were found to prevent cancer metastasis, and to regulate reactive oxygen species production and some triterpenes play a role in neuroregulation [271,273].

The chemical content of *B. papyrifera* essential oil is different than all other *Boswellia* resins, and is characterized by a high content (around 60%) of esters such as octyl acetate and incensole acetate, and is generally rich in diterpenoids (cembrene A, incensole, verticillatriene) [117,125,229,271,274–276]. Octyl acetate is actually a typical marker of Tigray-type incense, which presents also a specific citrusy-like notes. It is used nowadays in Europe but also in Orthodox churches of Ethiopia. *B. papyrifera* has often been confused with other *Boswellia* species in the past, thus, the published work on *B. carterii* focuses in reality on *B. papyrifera* species [126,229,277].

Despite the fact that *B. papyrifera* was already investigated, the diterpenic fraction still needs to be characterized, as these compounds are present in greater quantities than in other incense species, and some of them display interesting medicinal properties [127]. The aim of our contribution is to bring additional information on this generally poorly described part of the essential oil. A long-term hydro-distillation was undertaken in order to extract exhaustively all the volatile and semi-volatile compounds from the resin, and to obtain the best possible yield.

III.2. Material and methods

A. Raw material and hydro-distillation

One kg of *B. papyrifera* resin from Ethiopia, supplied by A. Al-Harrasi (University of Nizwa, Oman), was hydro-distilled during 1154 hours, in a Clevenger apparatus. Each essential oil fraction collected was followed by filtering the oil on small pad of magnesium sulfate, to ensure the sample was dried before its analysis by GC-MS. The 33 essential oils fractions collected over time were stored at room temperature in an opaque storage box to preserve essential oil components from deterioration.

Another 900g of *B. papyrifera* resin (3x300g) were extracted with dichloromethane (DCM, 3x1.35L) by Soxhlet apparatus (ca. 86% yield).

B. Kugelrohr distillation

The kugelrohr distillation was launched on 255g of the DCM extract of *B. papyrifera*. The distillation took about 20 hours, and provided the head of distillation, representing around 16% of the extract, that was analyzed through GC-MS apparatus, and fractionated. During the distillation, the extract was heated up

to 168°C under vacuum, and agitated through a rotative movement of the apparatus. The distillate obtained was trapped in a cooled round-bottom flask in a bath at 0°C.

C. GC-MS analyses

GC-MS analyses were performed on an Agilent Gas Chromatograph 6890N and a Mass Selective Detector 5973N (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) working in electron impact (EI) mode at 70 eV. The gas chromatograph was equipped with a fused silica capillary HP-5MS column (30 m × 0.25 mm i.d., film thickness: 0.25 µm; Agilent Technologies). The apparatus operated in the following conditions: the carrier gas was helium at a flow rate of 2mL/min. The oven temperature was programmed from 100 to 260 °C at 5 °C/min, and held 8min. The injector (split ratio 25:1) and transfer line temperatures were set to 250 °C and 280°C, respectively.

A 1.0 µL sample was injected per run. Analyses of oil and fractions were made on 10% solutions in DCM.

LRI Linear Retention indices (LRI) were determined from the retention times of a series of n-alkanes with linear interpolation. The constituents were identified by comparison of their mass spectra and LRI with those of pure compounds registered in commercial libraries (NIST20) and literature data (Adams, 2007 and others)[278], and with a laboratory-made database built from authentic compounds.

D. Fractionation of the volatile fraction of the solvent extract

All the fractionation and extraction steps are mentioned in the flowchart **Figure 18**. The 40g obtained by kugelrohr distillation were fractionated over silica gel (Kuehne-Nagel, 63-200 µm), and gave 5 fractions. Fractions PE and PE/ED 95-5 and their subfractions were all fractionated over SiO₂-AgNO₃ (Silicycle, Spherical silica gel 90A, 25 µm) columns.

Fraction PE gave 6 fractions, and 3 of its sub-fractions were fractionated again and gave five, seven and five sub-fractions, respectively. Several of these sub-fractions were either submitted to NMR spectroscopy, passed on preparative-GC or, if needed, fractionated before compounds separation by preparative-GC. Fraction PE/DE 95-5 also gave 6 fractions, and its sub-fraction «85-106» was subjected to preparative-GC.

E. Preparative Capillary-Gas Chromatography

Isolation of compounds were performed using an Agilent 6890 Gas Chromatograph Plus (Agilent, Santa Clara, CA, USA) coupled to a preparative fraction collector (PFC) (Gerstel, Mülheim a.d. Ruhr, Germany). The GC was equipped with a Phenomenex ZB-5 megabore capillary column (30 m × 0.53 mm; 3.0 µm film thickness). The end of the column was connected to MCS2 multiple column switching system (Gerstel), which used a pressure- controlled stream of hydrogen of 100 kPa, to divert the analytes either to FID or to a heated transfer line connected to PFC. The deactivated fused-silica capillary restrictors (1 m x 0.1 mm for FID connection, and 1 m x 0.32 mm for PFC connection) provide a FID/PFC ratio of ~1/9. The transfer line and the PFC were maintained at 250°C. The injected volume was 1 µL in splitless mode, at 250°C. The minimal oven temperature was set at 175°C, and rise up to 240°C, at 5°C/min. Cutting times to trap compounds were defined in the Software of the GC operating under Chemstation Rev A.10.02/Gerstel Maestro 1.3.8.14., allowing for accurate automated operation.

F. NMR apparatus

All reagents and solvents were from Sigma Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). NMR Analyses were performed on a Bruker Avance (400 MHz) spectrometer (Bruker, FR-Wissembourg) at 25 °C in CDCl₃ or acetone-d₆.

III.3. Results and discussion

A. Essential oil of *B. papyrifera*

The essential oil of *B. papyrifera* was obtained after a total of 48 days, with a yield of distillation of 8% (**Figure 16** and Annexe 2).

The first collect of oil was carried out after only two hours of distillation, but already the most volatile compounds have appeared, and were identified by GC-MS analyses (**Figure 17**).

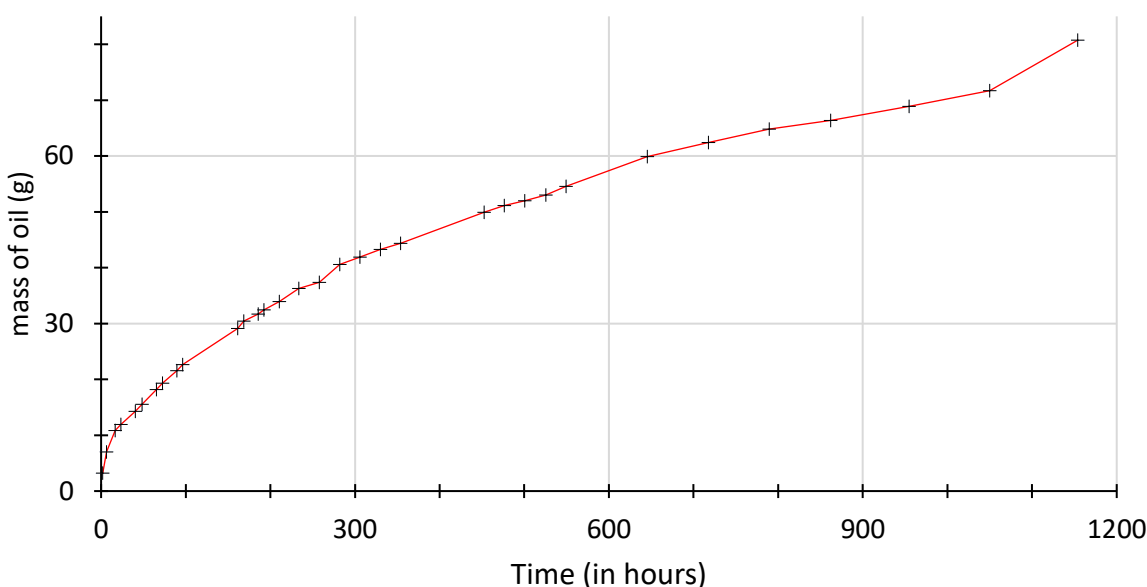


Figure 16 : Graphic representation of the mass of essential oil of *B. papyrifera* obtained over time. Each collect among the 33 collects of oil assessed are represented by the following symbol: “+”.

Monoterpenes such as sabinene, myrcene, limonene and β -ocimene were identified in the first fraction, as well as monoterpenoids such as linalool, citronellyl, geranyl, and neryl acetate, the sesquiterpenoid nerolidol, and octyl acetate. These compounds accounted for 90% of the first fraction. Then, after more than 210 hours of distillation and already accounting for 42% of the total oil collected, fraction n°15 contained the main diterpenes expected, such as cembrene A, cembrene, verticillatriene, but also diterpenoids such as incensole acetate, serratol and nepthenol. Several compounds detected supposed to belong to cembrene-type diterpene have been detected. The last fraction (n°33) obtained after 48 days, contained compounds similar than in fraction n°15, along with other unknown diterpenic compounds, and incensole. Surprisingly, we can notice that even after the obtention of fraction 15 that was already obtained after a long time of distillation, some compounds still continue to be released, as some acids and cembranoids observed in this fraction. These compounds could not be identified in the extract without such a long time of distillation. Chromatograms of these fractions are shown in **Figure 17** and Annexe 2.

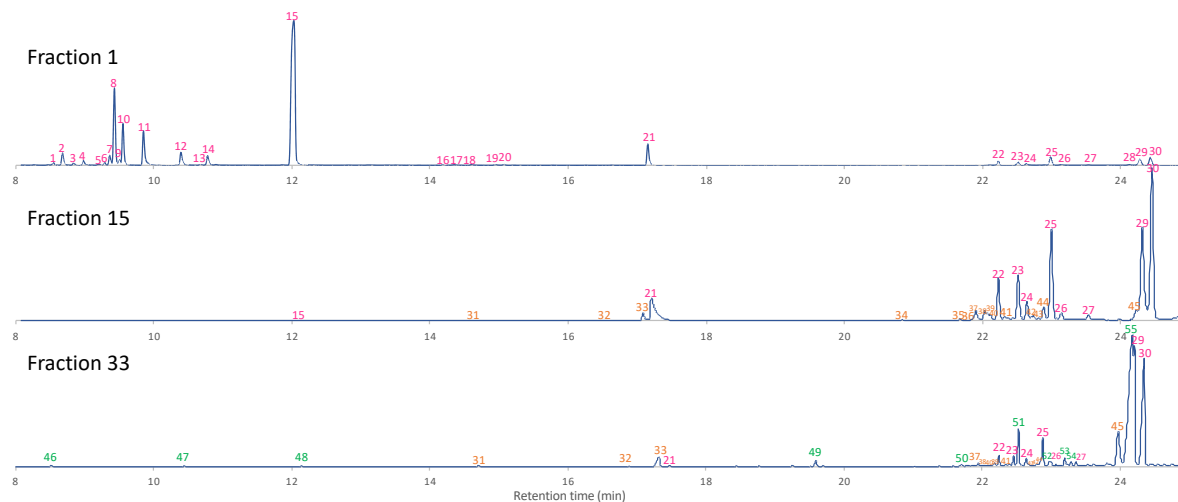


Figure 17 : GC-MS chromatograms of compounds found in 3 fractions obtained from the essential oil of *B. papyrifera*. Compound numbers in pink were found in the oil from the very first fraction, those in orange were compounds found in the oil after obtention of fraction 1 and until fraction 15, and those in green were found in oil after fraction 15. 1: sabinene; 2: myrcene; 3: n-hexyl acetate; 4: o-cresyl methyl ether; 5 (coelution): β -3-carene and α -terpinene; 6: p-cymene; 7: (Z)- β -ocimene; 8: limonene; 9: eucalyptol; 10: (E)- β -ocimene; 11: octanol; 12: linalool; 13: 4,8-Dimethyl-1,3,7-nonadiene; 14: 3,5-dimethylcyclohexene; 15: n-octyl acetate; 16: citronellyl acetate; 17: neryl acetate; 18: geranyl acetate; 19: n-decyl acetate; 20: copaene; 21: nerolidol; 22: cembrene A; 23: unknown diterpene ; 24: cembrene C ; 25: verticillatriene; 26: unknown; 27: unknown; 28: unknown; 29: serratalol; 30: incensole acetate ; 31: decanoic acid; 32: methyl laurate; 33: dodecanoic acid; 34-36: unknown diterpenes; 37: cembrene (thunbergene); 38-44: unknown diterpenes 42/43; 45: nephtenol; 46: 5-Methylfurfural; 47: n-octyl formate; 48: methoxy-methylphenol; 49: tetradecanoic acid; 50: n-hexadecanoic acid; 51-54: unknown diterpenoids; 55: incensole

In this resin, authors reported the presence of known diterpenoids but also of new ones, described for the first time in this species, such as cembrene, cembrene A, verticillatriene, incensole and incensole acetate [274,279]. The oil of this species is rich in ester and alcohol derivatives, and other research groups also reported octanol, octyl acetate, decyl acetate, and geranyl, citronellyl and neryl acetate to be present in *B. papyrifera* oil [117,229].

Except the fact that the monoterpenic compounds such as α -thujene, α -pinene and camphene were not detected in our essential oil, probably due to the high volatility of these compounds that were lost during these steps of oil extraction, we provide here a quite similar composition than these authors. For instance, similar compounds were also reported by the research group of Hamm et al. [274] such as monoterpenoids, octanol, acetate compounds, and some diterpenoids such as cembrene A, cembrene C, and incensole. However, some of these semi-volatile compounds remains to be identified properly, and some spectroscopic data that is often missing should be provided. Thus, we decided to pursue fractionation steps in order to isolate those compounds and to characterize them in a rigorous way.

B. Kugelrohr distillate of *B. papyrifera* extract

To separate the resin from its “gum” part, a dichloromethane (DCM) extraction was performed in order to extract all terpenic compounds from the resin. Then, to study the semi-volatile composition of *B. papyrifera*, a Kugelrohr distillation was assessed on the DCM extract of the resin and yield a distillate of

40.8g after five days of distillation (annexe 2). The composition of its volatile fraction is reported in the **Table 3** below.

Table 3 : Constituents of the Kugelrohr distillate of *Boswellia papyrifera*

LRI ^a	LRI ^{Litt.} ^b	Identification (number)	Area (%)
-	1118	4,8-Dimethyl-1,3,7-nonadiene (13)	0.02
1210	1211	octyl acetate (15)	4.97
1274	1274	3,5-dimethoxytoluene	0.03
1350	1347	citronellyl acetate (16)	0.04
1359	1358	neryl acetate (17)	0.01
1364	1360	decanoic acid (31)	0.04
1379	1381	geranyl acetate (18)	0.04
1390	1388	copaene (20)	0.02
1410	1409	n-decyl acetate (19)	0.06
1526	1526	methyl laurate (32)	tr
1567	1565	E-nerolidol (21)	4.51
1569	1570	dodecanoic acid (33)	tr
1765	1769	tetradecanoic acid (49)	0.11
1779	1775	benzyl benzoate	0.10
1819	-	unknown compound (34)	0.05
1862	-	unknown compound (35)	0.16
1916	-	unknown compound (56)	0.15
1938	1939	cembrene (37)	1.15
1944	-	unknown compound (36)	0.33
1952	-	unknown compound (38)	0.72
1963	-	unknown compound (40)	0.41
1970	1970	cembrene a (22)	4.10
1972	-	unknown compound (68)	tr
1979	-	unknown compound (41)	0.30
1982	-	unknown compound (39)	0.78
1987	-	unknown compound (41.1)	0.48
1990	-	unknown compounds (23 and 23bis)	2.58
1995	-	unknown compound (51)	1.72
2007	-	unknown compound (57)	0.50
2015	2002	cembrene C (24)	2.62
2026	-	unknown compound (44)	0.12
2033	2027	verticillatriene (25)	8.09
2045	-	unknown compound (26)	1.64
2046	-	unknown compound (58)	0.56
2056	-	unknown compound (59)	0.66
2077	-	unknown compound (54)	0.18
2080	-	unknown compound (27)	0.53
2092	-	unknown compound (60)	0.73
2101	-	unknown compound (61)	0.20
2109	-	unknown compound (62)	0.20
2134	-	unknown compound (63)	0.17
2145	-	unknown compound (64)	0.16
2155	2139	nepthenol (45)	4.11
2172	2158	serratol (29)+incensole (55)	33.04
2185	2189	incensole acetate (30)	21.16
2254	-	unknown compound (65)	0.21
2288	1118	unknown compound (66)	0.15

-	1211	unknown compound (67)	0.16
		Unknown compounds (26)	13.9
		Total identified (22)	84.2
		Unidentified trace compounds (<0.1%)	1.9

Linear Retention Indices determined experimentally by GC-MS on the DB-5MS column^a, calculated using the homologous series of C₉-C₂₃ *n*-alkanes. Linear Retention Indices from literature (Adams 2017) and NIST20 and ESO2000 databases^b. Relative area percentages of peaks were determined based on GC-MS analyses. Trace compounds with a relative area inferior to 0.1% were not reported. *compounds isolated and characterized by NMR.

A total of 48 compounds (>0.1%) were detected in the Kugelrohr distillate, among which only 22 compounds were identified. Nine diterpenoids represent by themselves almost 84% of the distillate obtained by Kugelrohr distillation. Twenty-six components of this distillate remain to be identified and characterized. These compounds, accounting for 13,9% of the distillate, seem to be unknown diterpenoids, according to their mass spectra and retention index that are reminiscent to other diterpenoids identified.

To characterize these unknown compounds, several fractionation experiments by column chromatography (SiO₂ and SiO₂-AgNO₃ 10%) and preparative GC were performed, before NMR analysis of some of these unknown compounds.

C. Fractions obtained from the kugelrohr distillate of *B. papyrifera* extract

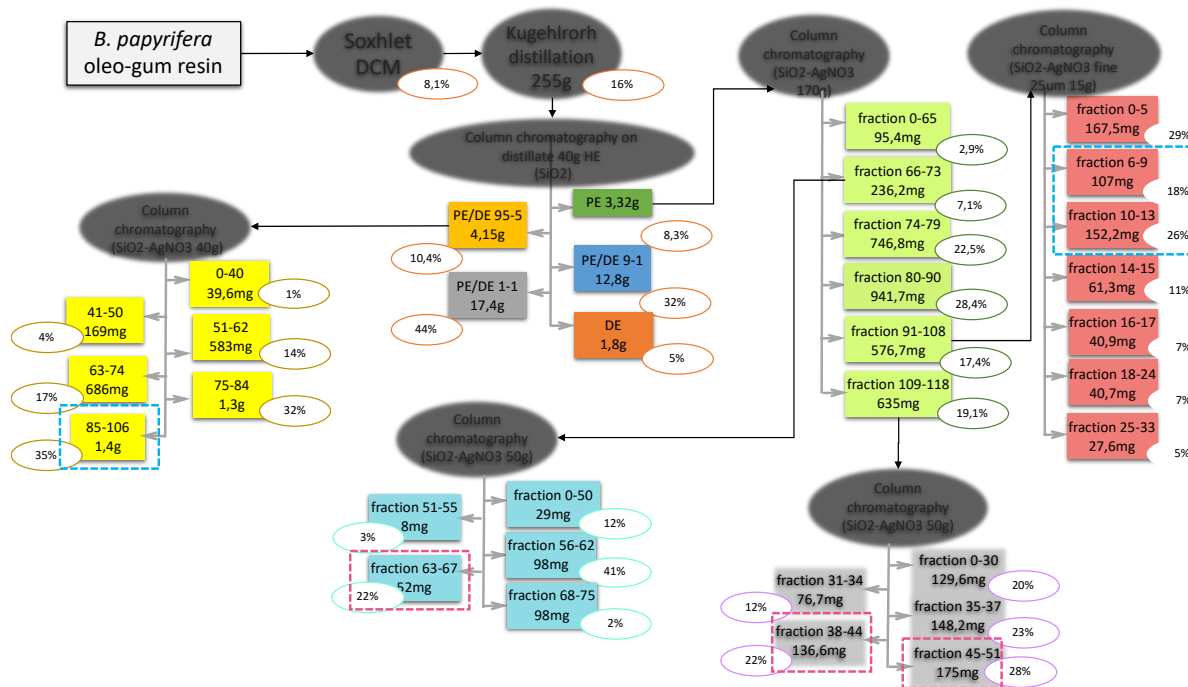


Figure 18 : Flowchart representing the fractionation steps of *B. papyrifera* distillate from Kugelrohr. Blue dashed rectangles correspond to fraction that were subjected to preparative-GC for further compound isolation and characterization. Pink dashed rectangles correspond to fractions that were analyzed directly by NMR after column purification of compounds.

Several discrepancies are present in the literature concerning the naming and the chromatographic and spectral data of the diterpenic constituents of *Boswellia* species. Hence, as shown by the recent review

on cembrane-type diterpenoids, some data is still missing for some compounds.[127] The mass spectra reported for these compounds significantly differ from one study to another works. For instance, Mikhaeil et al. [280] described cembrene and isocembrene but without the mention of relative intensity and thus, those similar compounds can all be confused together because of their similar ions in their MS spectra. The reported relative intensities of the ions in the MS spectrum of Cembrene C reported by Vanderah et al in 1976 [281], is not in adequation with the MS spectra reported by other authors or in databases.

Moreover, cembrene C was reported with a RI of 1645 by Hanuš et al whereas it was reported with a RI of 2002 by Hamm et al., following its analysis on a same phase capillary column in GC-MS [274,279].

To correctly assign MS and NMR data to cembrane-type diterpene, several diterpenoids were extracted and isolated from *B. papyrifera* after several steps of oil fractionation.

The first step consisted in the separation of the diterpenes from the heavy diterpenoids, accounted for 58% of the oil, in order to get fractions enriched in cembrane-type diterpenes. The first two fractions obtained were totally devoid of incensole, serratol and nepthenol, and were thus enriched in other cembranoids (**Figure 19**). Compared to PE fraction, the fraction PE/DE 95-5 contains, in addition to compounds already seen in PE fraction, the diterpenoid incensole acetate, and the unknown compounds 51, 44, 58 and 59 as trace compounds. The main difference between both fractions was the content of compound 24 (cembrene C), that was present in larger amounts in fraction PE/DE 95-5.

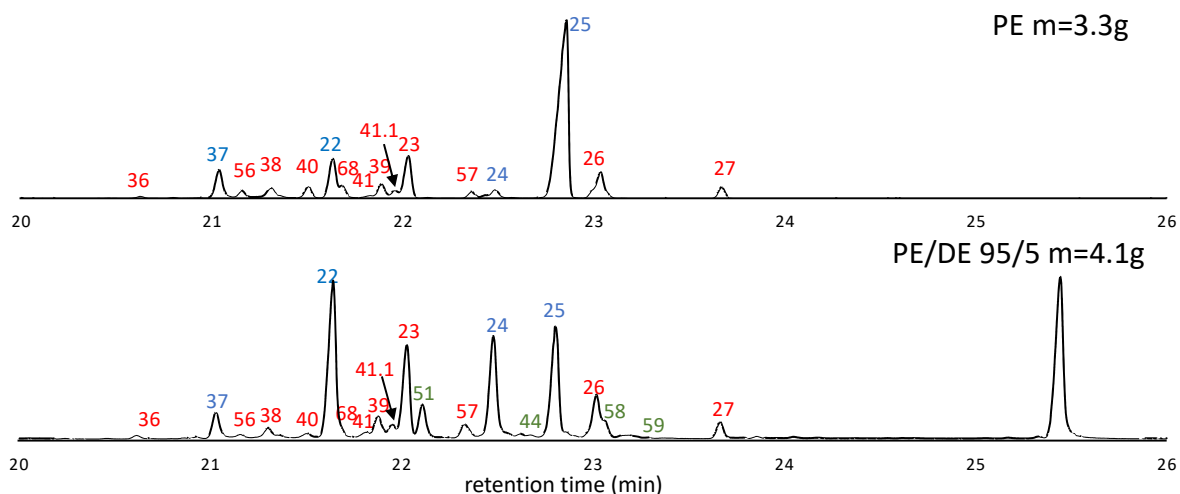


Figure 19 : GC-MS chromatograms of fractions PE and PE/DE 95-5 from *B. papyrifera* kugelrohr distillate. Compounds numbers correspond to those already reported in Table 1 and in Figure 2. Numbers in blue are compounds already identified before fractionation steps, red numbers correspond to unknown compounds, and green compounds correspond to unknown compounds only found in PE/DE 95-5 fraction.

In PE fraction, other compounds were also isolated and characterized (**Figure 20**). For instance, we managed to isolate compounds 37 (cembrene), 38, 22 (cembrene A), 23, 23bis and 25 (verticillatriene) by fractionation steps, and they were analyzed by NMR and/or by their MS spectra. NMR data and attributions are provided for cembrene A, isocembrene and cembrene in Annexe 2. Cembrene C was already known and well described in the literature and was not isolated here.

Moreover, compounds 23, 23bis, 26 and 38 could not be identified based solely on their LRI and MS spectra because no correspondence was found in databases, and their structures are still in course of elucidation, thanks to NMR analyses.

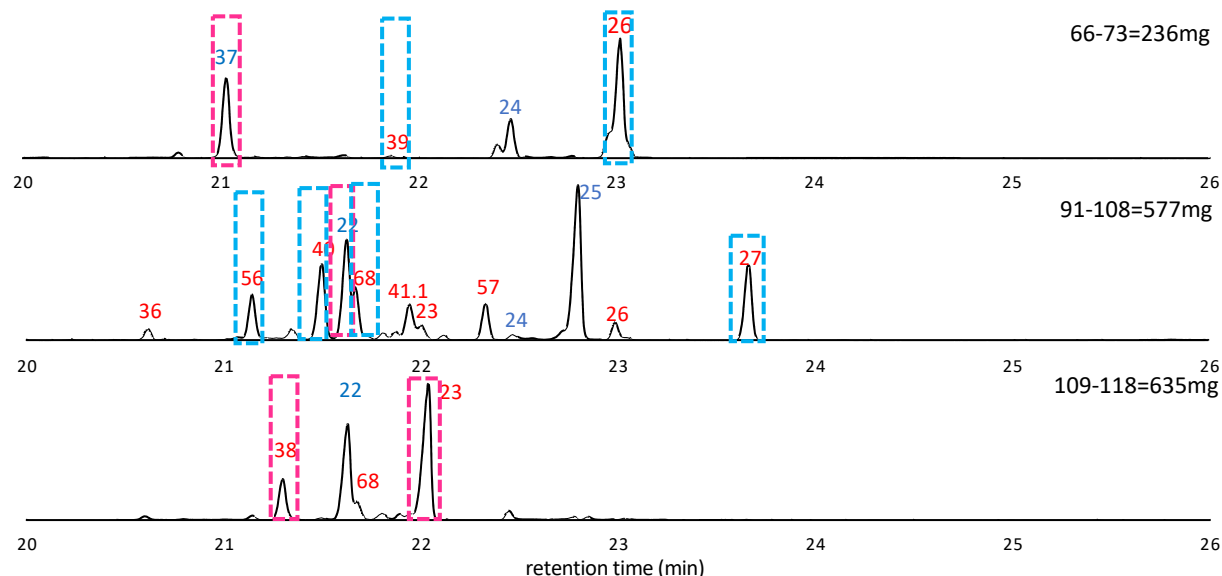


Figure 20 : GC-MS chromatograms of sub-fractions of PE fraction from *B. papyrifera* kugelrohr distillate. Compounds numbers correspond to those already reported in Table 1 and in Figure 2. Numbers in blue are compounds already identified before fractionation steps, red numbers correspond to unknown compounds. Pink dashed rectangles show compounds that were isolated and characterized by NMR. Blue dashed rectangles show compounds that were isolated by preparative-GC before to be characterized by NMR.

III.4. Conclusion

Here, semi-volatiles diterpenes of *B. papyrifera* were deeply characterized, with robust analytic devices such as preparative-GC, NMR, and GC-MS. Seven compounds were isolated and analyzed by NMR, and only three compounds (cembrene A, verticillatriene, cembrene) were already reported in *Boswellia* species in the literature. Due to missing data in the literature, those compounds were isolated to be characterized properly by NMR analyses to fill the lacking data. Among those isolated compounds, four unknown, probable cembrane-type compounds, were isolated, identified with their mass spectrometric data, and analyzed by NMR. Structural elucidation is still in course for some of these compounds, that could be identified for the first time in *Boswellia* species.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux menés sur les espèces d'encens *Boswellia dalzielii* et *Boswellia papyrifera* ont permis la quantification de composés volatils et semi-volatils de leur huiles essentielles, mais aussi de certains composés non-volatils de la résine de *B. dalzielii*.

Pour la première fois chez *B. dalzielii*, les tests d'activité mis en place ont pu révéler la forte propriété anti-inflammatoire de cette espèce peu étudiée. De plus, les résultats obtenus montrent que des composés déjà connus pour leurs activités biologiques sont présents à des concentrations élevées dans l'huile essentielle mais aussi dans la résine de cette espèce, comparée à d'autres espèces d'encens. C'est la raison pour laquelle les travaux menés sur cette espèce doivent être poursuivis, afin de la valoriser en exposant son fort potentiel médicinal. Par ailleurs, chez *B. papyrifera*, seuls les diterpènes majoritaires de l'huile essentielle avaient pu être identifiés par d'autres auteurs jusqu'à ce jour, ainsi, ce travail a permis de compléter les données de caractérisation manquantes sur les diterpènes déjà connus mais a également permis d'isoler des diterpènes potentiellement inconnus (en cours de caractérisation) de cette espèce. Ainsi, ces travaux permettent ensemble de compléter les connaissances relatives à la composition de plusieurs espèces d'encens, et ouvre la voie à de nouvelles possibilités quant à leur valorisation, pour le contenu en diterpènes d'intérêt médicinal.

Les cembranes de *B. papyrifera* ayant une structure assez proche, une séparation sur des phases stationnaires spécifiques pourrait permettre une meilleure séparation.

CHAPITRE III

CARACTERISATION ET VALORISATION DE MATIERES PREMIERES AROMATIQUES A INTERET OLFACTIF

I. CONTEXTE DES ÉTUDES

Les odorants issus de produits naturels sont omniprésents dans notre quotidien et sont involontairement captés par nos récepteurs olfactifs. Ces sensations olfactives, transformées par l'intermédiaire de notre cerveau, nous offrent alors une représentation mentale des odeurs que nous percevons. Qu'elles soient agréables, qu'elles soient des signes d'alerte ou d'autres émotions, elles sont souvent complexes et peuvent être composées de nombreux odorants. On estime que le marché mondial des odorants, que ce soit pour la parfumerie ou les arômes, pourrait atteindre près de 37 milliards de dollars d'ici 2024 [104]. C'est la raison pour laquelle, les composés odorants naturels, issus de matières premières végétales par exemple, sont d'autant plus recherchés par les industriels.

La connaissance des odorants des matières végétales est primordial pour leur synthèse et leur ajout dans diverses préparations parfumées et arômes. Ainsi, l'analyse et l'identification des composés volatils des huiles essentielles est un domaine de recherche actuel et en plein essor, et de nombreuses collaborations entre les industries agro-alimentaires ou cosmétiques et les chercheurs sont mises en place pour la recherche des odorants.

Aussi, un regain d'intérêt pour la recherche d'odorants dans des matières végétales anciennes telles que la myrrhe, l'encens et le ciste, utilisées pour leur odeur depuis la nuit des temps est observé. Récemment, les acides olibaniques, responsables de la note typique de « vieille-église » de l'encens ont été isolés, et caractérisés [153]. Cependant, aucun travail n'a été effectué sur la quantité précise de ces odorants dans les huiles essentielles d'encens. Il est donc nécessaire de mettre en place une méthode de quantification de ces acides pour permettre d'authentifier les résines et pour mieux connaître et valoriser ces résines pour leurs propriétés olfactives. Par ailleurs, la myrrhe et le ciste sont également exploités pour leur fragrance, mais malheureusement, très peu de travaux sur leurs odorants sont recensés dans la littérature et, lorsque c'est le cas, seule une partie des composés contribuant à l'odeur globale de leurs huiles essentielles a pu être identifiée avec certitude.

Des techniques d'olfactométrie couplées à des techniques d'analyses performantes permettent une meilleure approche pour l'étude de ces composés odorants. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons dans un premier temps à l'étude des odorants clés de l'encens : les acides olibaniques, en les quantifiant de façon rigoureuse dans plusieurs huiles essentielles d'encens, provenant d'arbres d'origine géographique différentes. Ensuite, nous nous intéresserons aux huiles essentielles de myrrhe, puis de ciste, et nous présenterons les travaux menés pour permettre l'identification des constituants à fort impact olfactif qui les composent.

II. ÉTUDE DES ODORANTS DE *BOSWELLIA SACRA*

Partie basée sur la publication (soumise):

Quantification of olibanic acids in *Boswellia sacra* essential oils by stable isotope dilution analysis

Authors: Kimberley Massei¹, Elise Carenini², Nicolas Baldovini¹

¹ Institut de Chimie de Nice, Université Côte d'Azur, CNRS, UMR 7272, Parc Valrose, 06108 Nice (France)

² Albert Vieille -Givaudan, 629, route de Grasse, 06227 Vallauris (France)

Abstract:

Cis- and trans-olibanic acids were recently reported as key contributors to the typical church-like odor of frankincense (*Boswellia* ssp. gum resin), despite their relatively low amount in the order of a few hundreds of ppm. Because of their organoleptic importance, an accurate quantification of these compounds would be useful for quality control. This contribution presents an accurate method of quantification of olibanic acids. [²H₂]-cis- and trans-olibanic acids were synthesized and used for stable isotope dilution assay (SIDA) to quantify both isomers of olibanic acids by GC-MS, in various samples of *Boswellia sacra* gum resin. The method was validated by determining linearity, recovery, accuracy, matrix effect, repeatability, intermediate reproducibility, LODs and LOQs. Calibration curves showed good correlation coefficients ($r^2 > 0.998$). The quantification of olibanic acids was accurate and reproducible over ten days since variation coefficient of intermediate precision was inferior to 3%. Limits of quantification for trans- and cis-olibanic acids were about 3.01 and 1.91 µg/mL, respectively.

Keywords: Boswellia; frankincense; essential oil; olibanic acids; SIDA

II.1. Introduction

Frankincense (olibanum), is a gum resin collected from *Boswellia* species endemic to the Horn of Africa, the Middle East and India. It is used since very ancient times for its olfactory and medicinal properties. Olibanum has been mentioned in loads of ancient texts, especially in religious manuscripts, and is one of the oldest perfume used by man [209]. By about 2,000 years ago, societies already used this resin, and several archaeological materials were reported to contain frankincense. It was indeed found in incense burners since the first century AD [282] and its utilization continued during Middle Age in funerary practices [283]. Nowadays, the rite of incense burning is still present in the Middle East and in catholic and orthodox religious ceremonies. Frankincense fragrance is also an ingredient of some modern perfume compositions such as “Guerlain, Les Absolus d’Orient, Encens Mythique”, “Colonia, Replique” and frankincense essential oil is often used as a base note, as in “Fragonard, Encens - Fève Tonka”, “Chanel, n°22”, “Revlon – Charles of the Ritz” or “Capucci, De Capucci” [11,284,285]. Paradoxally, although this aromatic gum resin is one of the oldest plant material used for its odorant properties, the characterization of its main key odorants received little attention until very recently [153,286].

Several authors reported on the comparison of *Boswellia* species compositions, and some chemotaxonomic markers were highlighted. For instance, several volatile compounds or class of compounds are specific of some *Boswellia spp.* and can be considered as markers for robust quality control for resins. *B. neglecta* was shown to contain borneol while *B. serrata* is characterized by the presence of phenylpropanoids like methyl eugenol. *B. papyrifera* is composed of a high percentage of octanol / octyl acetate and diterpenoids while *B. frereana* and *B. sacra* mostly contain monoterpenoids and sesquiterpenoids, with α -phellandrene dimers as specific markers of *B. frereana* [125,287–289].

Recently, some odor-active compounds were quantified in *B. sacra* with Stable Isotope Dilution Assay (SIDA), using Thermal Desorption Unit-Gas Chromatography-Mass Spectrometry (TDU-GC-MS) [290]. However, little is known about the concentration of olibanic acids **1-2**, which were reported later as responsible of the characteristic old church-like base note of frankincense [153]. In this study, GC-FID quantifications showed that these compounds are present in the range of a few to several hundreds of ppm in the essential oils of various *Boswellia* species, but a more accurate method is required to quantify these highly important trace odorant constituents. For this purpose, this contribution presents the stable isotope dilution analysis (SIDA) by GC-MS to quantify precisely **1-2** in frankincense gum resins and essential oils.

The best advantage of this approach lies in the fact that since it uses a deuterated isotopomer as internal standard instead of a structurally similar compound, the behavior of the deuterated standard will be closer to the analyte itself all along sample preparation and extraction processes. Therefore, it will avoid matrix effects, reduce errors and compensate losses that would occur when using a non-isotopic internal standard, allowing a more accurate quantification of trace analytes [291–295].

The SIDA method reported here is based on GC-MS analyses of acidic extracts of frankincense essential oils spiked with synthesized [²H₂]-*cis*- and *trans*-olibanic acids **3-4**. To validate this approach, the linearity of the calibration curves, the recovery efficiency, the repeatability and other parameters were evaluated. This method was then applied to quantify **1** and **2** in several samples of *B. sacra* (syn. *B. carterii*) from different geographical origins.

II.2. Material and Methods

A. Gum resins and essential oils

Boswellia sacra resin samples were provided by our network of reliable expert suppliers and were collected from different regions of the Arabian Peninsula (Oman, Yemen), Somalia and Somaliland (see **Table 3**). Hence, ten samples of *B. sacra* gum-resins were hydrodistilled for 15 hours in a Clevenger apparatus, to provide their essential oils (EO) that were used afterwards for quantification studies.

B. Solvents and reagents

All solvents and reagents were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France) or VWR (Fontenay-sous-bois, France). Silica gel (60M 40-63 μm) was supplied by Macherey-Nagel (Düren, Germany).

C. GC-MS analyses

GC-MS analyses were performed on an Agilent GC 6890N Gas Chromatograph coupled to an Agilent 5973N Mass Selective detector working in electron impact mode (70 eV). The analyses were performed on a FFAP capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness, Macherey-Nagel). The carrier gas was helium at a flow rate of 0.8 mL/min. The oven temperature was programmed from 50 to 240 $^{\circ}\text{C}$ at 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and held isothermal for 15 min. The injector (split mode, ratio 25/1) temperature was 250 $^{\circ}\text{C}$. The temperatures of the ion source and transfer line were 250 and 280 $^{\circ}\text{C}$, respectively. GC-MS analyses were also carried out on a 6890N GC - 5973 MSD (Agilent) equipped with a fused silica capillary column HP-20 (50 m \times 0.2 mm i.d., film thickness: 0.1 μm ; Agilent Technologies) and operating in the same conditions as above except for the following parameters: the oven temperature was programmed from 50 to 220 $^{\circ}\text{C}$ at 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and held isothermal for 25 min, and the injector (split mode ratio 20/1) and transfer line temperatures were 240 $^{\circ}\text{C}$.

D. Synthesis of olibanic acids (1-2) and their [$^2\text{H}_2$]- isotopomers (3-4)

The syntheses of (\pm)-*trans*-2-octylcyclopropyl-1-carboxylic acid **1** and of (\pm)-*cis*-2-octylcyclopropyl-1-carboxylic acid **2** were performed according to the procedures described by Cerutti-Delasalle et al. [153]. The same approach was applied for the syntheses of their [$^2\text{H}_2$]- isotopomers (**3-4**), using CD_2I_2 as reagent for the cyclopropanation step, and with some slight modifications of the procedure (see **Figure 21**).

E. [$^2\text{H}_2$]-*trans*-2-octylcyclopropyl-1-methanol **5**

To a cooled (-60°C) solution of (*Z*)-undec-2-en-1-ol **6** (1.26 g, 7.4 mmol, 2 eq.) in petroleum ether (33 mL), 7.6 mL of a 1M solution of diethylzinc (7.6 mmol, 2 eq.) was added dropwise under stirring, followed by CD_2I_2 (1 g, 3.7 mmol, 1 eq.). The reaction mixture was left under stirring for 14h, during which time it warmed to room temperature. The reaction mixture was then treated by the addition of a saturated solution of ammonium chloride (70 mL) under stirring. After decantation, the organic phase was washed with brine, dried on MgSO_4 and evaporated to dryness to afford a yellow oil (1.27 g). This oil was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of petroleum ether with increasing amounts of diethyl ether to provide 1.2 g of a mixture of **5** and unreacted **6** (ca. 47/53, resp.). This mixture was then added to a suspension of manganese dioxide (18.5 g, 213 mmol) in acetone (37 mL) and stirred at room temperature for 3h. The reaction mixture was then filtrated on Celite[®] and the filtrate was evaporated to

furnish a mixture which was purified by column chromatography on silica gel (petroleum ether / diethyl ether) to give **5** (0.403g, 56% yield from **6**).

F. $[^2\text{H}_2]$ -trans-2-octylcyclopropyl-1-carboxylic acid **3**

A solution of chromium trioxide (10.1 g, 23.3 mmol, 10.5 eq.) in 36% sulfuric acid was added dropwise to a solution of **5** (0.38 g, 2.2 mmol, 1 eq.) in acetone (14 mL) under stirring at 0°C. The reaction mixture was slowly warmed to RT in 3h, and evaporated. The residue was diluted with 100 mL water and the resulting mixture was extracted twice with 100 mL ED and once with 50 mL ED. The combined organic phases were then washed with water, twice with brine, and finally dried on magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure to afford **3** that was purified by column chromatography on silica gel (petroleum ether / diethyl ether) (0.268g, 33% yield from **6**). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.48-1.26 (m, 16H), 0.88 (t, J = 6 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 181.53, 33.10, 32.01, 29.67, 29.42, 29.40, 29.19, 24.05, 22.80, 20.08, 14.22 ppm. MS (EI, 70 eV) : 182 (2), 115 (21), 102 (27), 98 (34), 97 (41), 85 (22), 84 (31), 83 (42), 75 (100), 70 (45), 69 (51), 57 (38), 56 (51), 55 (51), 43 (49).

G. 2.4.3 $[^2\text{H}_2]$ -cis-2-octylcyclopropyl-1-methanol **7**

The procedure described here below for the synthesis of **5** was applied to (*E*)-undec-2-en-1-ol **8** and provided eventually **7** (0.294 g, 31% yield from **8**).

H. 2.4.4 $[^2\text{H}_2]$ -cis-2-octylcyclopropyl-1- carboxylic acid **4**

The procedure described here below for the synthesis of **3** was applied to **7** and provided eventually **4** (0.21g, 31% yield from **8**). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.69-1.61 (d, 1H), 1.6-1.47 (m, 2H), 1.46-1.12 (m, 14H), 0.87 (t, J =7.2 Hz, 3H), ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 180.30, 31.99, 29.64, 29.41, 29.40, 26.92, 23.13, 22.78, 18.01, 14.17 ppm. MS (EI, 70 eV) : 182 (2), 102 (32), 101 (26), 98 (44), 97 (50), 84 (38), 83 (46), 75 (100), 70 (51), 69 (56), 57 (39), 56 (54), 55 (53), 43 (49), 41 (47).

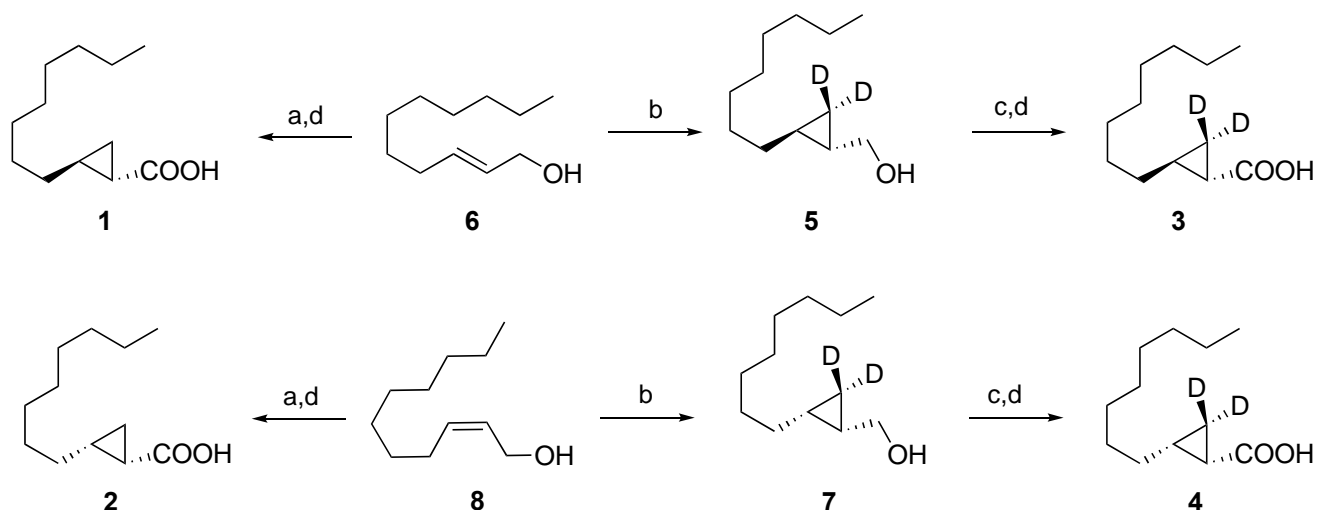


Figure 21 : Reagents and conditions.

.a) Et_2Zn , CH_2I_2 , n-hexane, 35°C \rightarrow RT, 13 h; b) Et_2Zn , CD_2I_2 , Petroleum Ether, 60°C \rightarrow RT, 14 h; c) MnO_2 , acetone, RT, 3h d) Jones reagent, acetone, RT, 3 h (yields over all steps: **1**, 56%; **2**, 68%; **3**, 48%; **4**, 31%).

I. Follow-up of olibanic acids extraction during hydro-distillation by standard addition method

A 79 g sample of milled *B. sacra* gum resin from Somalia was hydro-distilled in a Clevenger apparatus, and EO samples were taken every 2 hours during 16 hours, then at longer intervals of time until almost 100 hours, in order to follow the kinetic of an exhaustive extraction of olibanic acids during hydro-distillation, using the standard addition method to quantify **1** and **2** by GC-MS. For their analysis, each sampling was at first submitted to a liquid-liquid basic extraction to prepare EO acidic extracts. Typically, the EO from each collect was diluted in Methyl tert-Butyl Ether (MTBE) (1.8 mL) and extracted twice with 1 mL of 2 M aqueous sodium hydroxide solution, by shaking and centrifugation cycles (6000 rpm, 3 min) in a tightly stoppered 15 mL centrifugation tube. The basic aqueous phases collected after centrifugal decantation were gathered, washed with 2 × 2 mL MTBE, added with 2 mL dichloromethane and cooled in an ice bath. Then, 1 mL of a 6N hydrochloric acid aqueous solution was slowly added, and the mixture was agitated. The aqueous phase was then extracted again with 2 mL dichloromethane, and the combined organic phases were dried by filtration through a small pad of magnesium sulfate in a Pasteur pipette, evaporated under vacuum, dissolved in 1mL toluene and analyzed by GC-MS (HP-20 capillary column). Analyses were performed in Selected Ion Monitoring (SIM) mode, with qualifier ions at $m/z = 83$ and 97 , and quantifier ions at $m/z = 69$ and 73 . The standard addition method was used to quantify **1** and **2** in the extracts, and for this purpose, solutions of synthesized **1** and **2** were spiked in 100 μ L of each sample, and the solution was completed with toluene to reach a concentration of spiked analyte at 0.1, 0.2 and 0.4 mg/mL before analysis, in order to determine the concentration of the non-spiked sample.

J. SIDA Quantification of olibanic acids: procedure

The following procedure was applied to prepare EO acidic extracts for the quantification of **1** and **2**. A 2 g EO sample was diluted in Methyl tert-Butyl Ether (MTBE) (1.8 mL), spiked with 200 μ L of a 1 mg/mL solution of **3** and **4** and extracted with 2 × 1 mL of 2M aqueous sodium hydroxide solution by shaking and centrifugation cycles in a tightly stoppered 15 mL centrifugation tube. The basic aqueous phases were then gathered and subsequently washed with 2 × 2 mL MTBE, added with 2 mL dichloromethane and cooled in an ice bath. Then, 1 mL of 6N hydrochloric acid aqueous solution was slowly added, the mixture was vigorously shaken, and eventually decanted by centrifugation. The aqueous phase was extracted again with 2 mL dichloromethane, and the combined organic phases were filtrated on a small pad of magnesium sulfate in a Pasteur pipette, evaporated under vacuum, dissolved in 1mL toluene and analyzed by GC-MS on the FFAP column. Quantifications were made in SIM mode with quantifier ions at $m/z = 73$ and 75 and qualifier ions at $m/z = 83$ and 97 . Calibration curves were established with solutions of varying concentrations of **1-2** (0.004; 0.0625; 0.125 ; 0.25 ; 0.4 ; 0.5 ; 1 mg/mL of each) and a unique concentration of **3** and **4** of 0.25 mg/mL for each standard.

K. SIDA Quantification of olibanic acids: Validation of the method

A Model Matrix was prepared using an EO sample previously deacidified by basic extraction. This olibanic acids-free EO was spiked with known concentrations of analytes **1-2** or/and standards **3-4**, in order to validate the method. Once the matrix was spiked, the resulting Model Essential Oils (MEO) were then submitted to the SIDA quantification procedure described above. Validation parameters including precision (repeatability, accuracy, intermediate precision), linearity of the method, recovery, LOD, LOQ and matrix effects were investigated, according to the guidelines for the validation of analytical procedures [296].

K.1 Linearity of the model

A linear regression test was applied to the data obtained following the analysis of samples from 3 series of calibration curves. Six calibration points were used, at six different concentrations for **1** and **2**, and at a single concentration for **3** and **4**.

K.2 Limits of detection and quantification (LOD and LOQ)

Limit of detection (LOD) was first estimated on the basis of the signal to noise ratio (S/N) of the analyte, through the analysis in triplicate of 6 samples with different concentrations of **2**. The S/N was also approximated for **2**. LOD were considered to be reached with a S/N equal to 3 in this visual evaluation procedure [296]. Then, the analysis of both analytes in the presence of their deuterated analogues was performed as described in 2.6, in the range of these LOD. Analyses were performed for samples at 0.0015 mg/mL analyte concentrations, n=7. The LOD was then calculated according to Agilent technical note [297].

The LOD was calculated at a confidence threshold of 95%, corresponding to the t-test value =2.447 from a student's test table. This confidence level is reached for the analysis of at least 7 samples of values close to LOD value, considering residual background noise (average value of 7 blank samples). LOD was calculated using the following formula:

$$\text{LOD} = \frac{t_{\alpha} \times \sigma \times Q}{\bar{x}_A}$$

t-test value (t_{α})

standard deviation of analyte's areas (σ)

average value of areas (\bar{x}_A)

Quantity of analyte (Q)

The limit of quantification (LOQ) was estimated to be 3.3 times the LOD, as requested in the visual evaluation procedure.

K.3 Method accuracy and precision

The precision of the method was checked by evaluation of its repeatability by analyzing a MEO sample containing a same concentration (c.a. 0.25 mg/mL) of each standard and analyte. The experiments were carried out with three samples prepared in a same way, and values of concentration obtained after GC-MS analysis were analyzed to establish the variation coefficient (C.V.) (**Table 4**). Intermediate reproducibility was also investigated to check the stability of the model over 4 consecutive days (n=4), by analyzing each day a MEO (at 0.2 mg/mL of **1** and **2** and 0.25mg/mL of **3** and **4**) with the same procedure.

Accuracy was evaluated according to Matuszewski et al. method [298], by analyzing MEO samples containing the same Q concentration (c.a. 0.25 mg/mL) of **3** and **4** and varying concentrations of analytes **1** and **2** (0.25, 0.2, 0.15 or 0.1 mg/mL), in triplicate for each level of concentration (**Table 5**). Analyte recovery and accuracy were calculated based on data from method precision assay [299], as :

$$\text{Accuracy \%} = \frac{\text{averaged measured concentration}}{\text{expected concentration}} \times 100$$

$$\text{Recovery \%} = \frac{\text{averaged measured concentration}}{\text{averaged spiked concentration}} \times 100$$

II.3. Results and discussion

A. Follow-up of olibanic acids extraction during hydrodistillation by standard addition method

As we initially wanted to develop a single method adapted to the quantification of olibanic acids either in gum resin or EO samples, the hydrodistillation of the gum resin was naturally selected as a first step for the extraction of **1** and **2**. However, in this case, the accurate quantification of **1-2** in gum resin requires a sample preparation method leading to an exhaustive extraction of these compounds, since it occurs before the addition of the deuterated internal standards. To evaluate the exhaustivity of the hydrodistillation procedure, we followed the kinetic of extraction of **1-2** by quantifying these compounds in samplings of EO taken all along the procedure. The curve representing the cumulated mass of EO obtained in function of the time is shown in **Figure 22**, which also represents the cumulated mass of **1** and **2** calculated by standard addition method. During the first 16 hours (corresponding to the steepest slope of the curve until 30 hours) the EO was collected every two hours, then, at longer intervals of time until the end of the hydrodistillation, when a 6.7% total yield of EO was collected (5.27g). The extracted mass of **1** and **2** increased significantly during the first 30 hours and then, the slope of the curve decreased slightly after this period. A total mass of 5.41 mg olibanic acids was eventually obtained from the extraction of EO samples. In view of these results, a 15h hydrodistillation was kept as a good compromise between the extraction efficiency and the time and cost constraints, and is besides consistent with the distillation time of most industrial processes. Nevertheless, it shows that such a procedure is not adapted for an exhaustive extraction of olibanic acids in gum resin samples, and therefore the method developed hereafter can be used for their quantification in the EO, but does not permit to predict their total amount in the gum-resin.

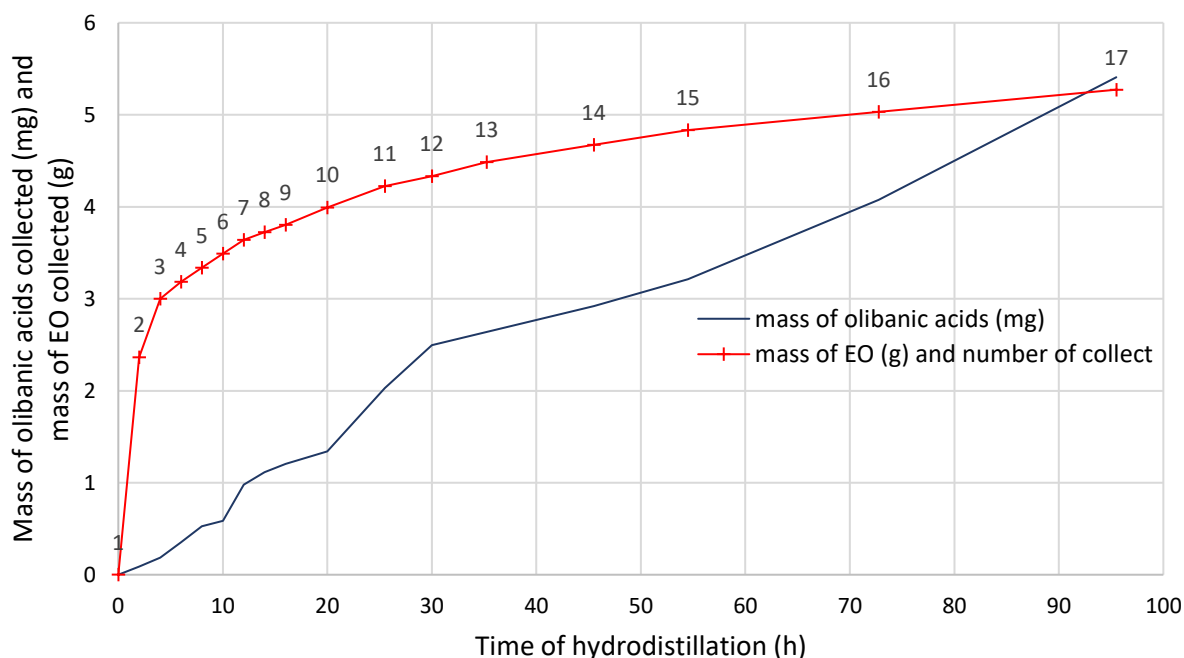


Figure 22. Evolution of EO and olibanic acids extraction in function of hydrodistillation duration.

B. Syntheses of [²H₂]-olibanic acids (3-4)

To deal with the relatively high cost of deuterated reagents, they were used in the last steps of the syntheses of **3-4**. Hence, [²H₂]-diiodomethane (CD₂I₂) was used in the Simmons-Smith cyclopropanations of allylic alcohols **6** and **8**. The conditions of this reaction reported in the original procedure for the syntheses of **1-2** [153] were also slightly modified to adapt to these price constraints, as CD₂I₂ was used as the limiting reagent. However, the chromatographic separation of **6** and **8** from their respective cyclopropanation products **5** and **7** in the crude products proved to be very difficult. To overcome this issue, these crude mixtures were treated by manganese dioxide to oxidize selectively **6** and **8** to their corresponding aldehydes, which could be separated more efficiently by column chromatography on silica gel.

C. SIDA Quantification of olibanic acids: optimization and validation of the method

C.1. Linearity of the method

The accurate procedure presented in this contribution for the quantification of olibanic acids is based on SIDA by GC-MS. It was built on the basis of previously published data, to fix the concentration range of **1** and **2** in the calibration curves. The choice of the suitable stationary phase for GC also required optimization. Good correlation coefficients were observed for calibration curves of **1** and **2** obtained from analyses on HP-1 and HP-20 capillary columns ($r^2=0.9822$ and $r^2=0.9844$, respectively), but their use for the analysis of real samples proved impossible because of the coelution of **1** with dodecanoic acid (an abundant acidic constituent of *Boswellia* EOs) on HP-1 column, and because **1** and **2** were not separated on HP-20 column. Our experiments with FFAP column were more successful, since this stationary phase allowed us to separate cleanly **1** and **2** without coelutions with other acidic constituents. As already reported by other authors, we noticed an inverse isotope effect in which the analytes elute at a higher retention time than their corresponding deuterated isotopomers [292].

The method was then validated by checking several parameters, such as precision (repeatability and intermediate precision), linearity, LOD, LOQ, recovery, matrix effects. The linearity of the method was judged acceptable as none of the variation coefficients exceeded 5% for calibration solutions (data not shown, $n=3$).

The linearity of each standard curve was confirmed by plotting the peak area (A) ratio versus the ratio of analyte concentration ([C]) over standard. The sample concentrations were calculated from the equation $y= ax + b$, as determined by weighted ($1/x^2$) linear regression of the standard line. The correlation between the two variables $\left(\frac{[C]_1}{[C]_3}, \frac{A_1}{A_3}\right)$ or $\left(\frac{[C]_2}{[C]_4}, \frac{A_2}{A_4}\right)$ was linear for both isomers and showed an excellent correlation coefficient: $r^2>0.999$ for **1** and $r^2>0.998$ for **2**.

C.2. Limit of detection and quantification

LOD was first evaluated by considering the S/N ratio, in order to determine a range of concentrations of analytes that were close to the LOD value. LOD was estimated to be close to 1 µg/mL for **1** and to 2 µg/mL for **2**.

The analysis of peaks areas of 7 spiked samples of MEO at 0.0015 mg/mL analyte concentrations, and the analysis of 7 blank sample gave us $LOD_1 = 0.913 \mu\text{g/mL}$, and $LOD_2 = 0.578 \mu\text{g/mL}$. LOQ were established as $LOQ_1 = 3.01 \mu\text{g/mL}$, and $LOQ_2 = 1.91 \mu\text{g/mL}$.

C.3. Repeatability, accuracy and intermediate precision

Precision of the assay was judged acceptable as none of the variation coefficients exceeded 5% for calibration solutions (data not shown). Accuracy values did not exceed 10%, and variation coefficients were satisfactory for intermediate precision as they were lower than 6%.

Table 4 : Intra-day and inter-day precision.

		1					2				
Intra-day precision	Replicate number	Concentration spiked in MEO (mg/mL)	C.V. (%) ¹	Measured concentration (mg/mL)	C.V. (%)	Average analyte recovery (%)	Concentration spiked in MEO (mg/mL)	C.V. (%)	Measured concentration (mg/mL)	C.V. (%)	Average analyte recovery (%)
		1	0.272		0.262			0.276		0.275	
	2	0.270	2.3	0.266	1.1	98.0	0.270	1.3	0.270	1.0	99.6
	3	0.261		0.260			0.274		0.272		
Inter-day precision	J1			0.183					0.203		
	J2			0.177					0.193		
	J3	N.D. ²		0.161	5.6	N.D.	N.D.		0.204	4.1	N.D.
	J4			0.168					0.187		

¹ Coefficient of Variation, ² N.D. : Non Determined

Table 5 : Accuracy measurement.

Spiked concentration (mg/mL)	Measured concentration (mg/mL)	
	Trans isomer	Cis isomer
0.25	average (n=3)	0.262
	Accuracy	5%
0.2	average (n=3)	0.190
	Accuracy	5%
0.15	average (n=3)	0.146
	Accuracy	3%
0.1	average (n=3)	0.094
	Accuracy	6%

C.4. Matrix effects cross contributions and method recovery

In SIDA methodology, where the labeled standard behaves like the analyte, we can theoretically neglect matrix effects and recovery assays. In practice, we prepared a Model Matrix for our spiking experiments in method validation, in order to be close as possible to the real conditions of analysis. As expected, the average analyte recovery was 98% for **1** and 99.6% for **2**, which confirmed the reliability of our approach. However, some authors mentioned that difficulties could arise if the deuterated isotopologue molecule has less than 3 deuterium atoms, because both internal standard and analyte co-elute, and cross-contribution could occur, leading to errors in quantification [300]. Here, only two deuterium were inserted

in the molecule, as a compromise between the cost of the synthesis, and the quality and accuracy of the quantification. Recent advances showed that it is generally assumed that there is no “cross-contribution” between analyte and its isotopologue, especially when good linearity is observed [301], and SIDA methodology still allows accurate quantification [291]. In a same way, if the deuterated isotopologue is too heavy (with more than five deuterium atoms), an hyperbolic calibration could be preferable than a linear one [300].

C.5. Specificity and selectivity

To enhance the selectivity for identification, the quantification of olibanic acids was realized in Selected Ion Monitoring (SIM) mode by taking account of the area ratios signals of the internal deuterated standard **3** or **4** with a quantifier ion at $m/z = 75$ and of the analyte **1** or **2** with a quantifier ion at $m/z = 73$. Qualifier ions were selected at $m/z = 97$ and $m/z = 83$. No coeluting peak from the raw material samples was detected around the retention time of the analytes or of the standards when analyses were carried-out on HP-20 and FFAP capillary columns.

D. Olibanic acids quantification in natural samples

Ten samples of *B. sacra* were analyzed to determine their content in **1** and **2**. The quantification of analytes in each sample was realized in duplicate and showed variation coefficients inferior to 10%. Both isomers were found in all samples ranging from 2 to 186 ppm for **1** isomer and from 2 to 21 ppm for **2** (Figure 23 and Table 6 : Average concentration of olibanic acids in essential oils samples.).

Table 6 : Average concentration of olibanic acids in essential oils samples.

Sample name (n=2)	Sample grade	Concentration of 1 (mg/kg EO)	C.V. ¹ of 1 (%)	Concentration of 2 (mg/kg EO)	C.V. of 2 (%)	Origin of the resin	Essential oil yield (%)
1	1	171	1.2	6	1.4	Somaliland	9
2	2	146	0.7	5	1.1	Somaliland	8.7
3	1	121	0.7	9	1.7	East Somalia	9.8
4	2	186	1.8	15	2.4	East Somalia	9.1
5	3	122	4.9	8	9.1	East Somalia	8.5
6	Green	2	0.2	5	1.6	Oman	13
7	Red	7	6.3	9	0.4	Oman	11
8	Black	2	3.6	12	0.5	Oman	13
9	1	10	8.1	21	0.0	Yemen	8.9
10	2	3	3.6	10	2.6	Yemen	8.4

¹ Coefficient of Variation

According to these results, the concentration of the trans isomer **1** is much higher in the samples of African origin than in those coming from the Arabian peninsula, while this trend is not clear for the cis isomer **2**. Traditionally, resins are manually graded by collectors according to the size and color of gum resin tears, and the presence of additional pieces of bark and wood, Grade 1 representing the highest quality with the higher amount of “pure” resin tears of pale yellow color. Alternatively, in Oman, good quality resins can be also classified according to atypical colors (samples 6-8). When considering the analytical results obtained here, no clear tendency could be observed on the influence of the grades on the amount of **1** and **2**. The analysis of a larger set of samples of secured origins covering all types of grades would help to clarify this tendency, but is out of the scope of the present study. Concerning the olfactory properties of

the samples, it should be mentioned here that the contribution of the olibanic acids to the old church-like base note of frankincense is certainly more significant in the samples where **1** and **2** are in higher amounts, but since the olfactory threshold of **2** was estimated to be almost 100 times lower than **1** [153], their overall participation to the odor is not less important in the samples from Yemen and Oman than in the resins from Africa which are more rich in **1**.

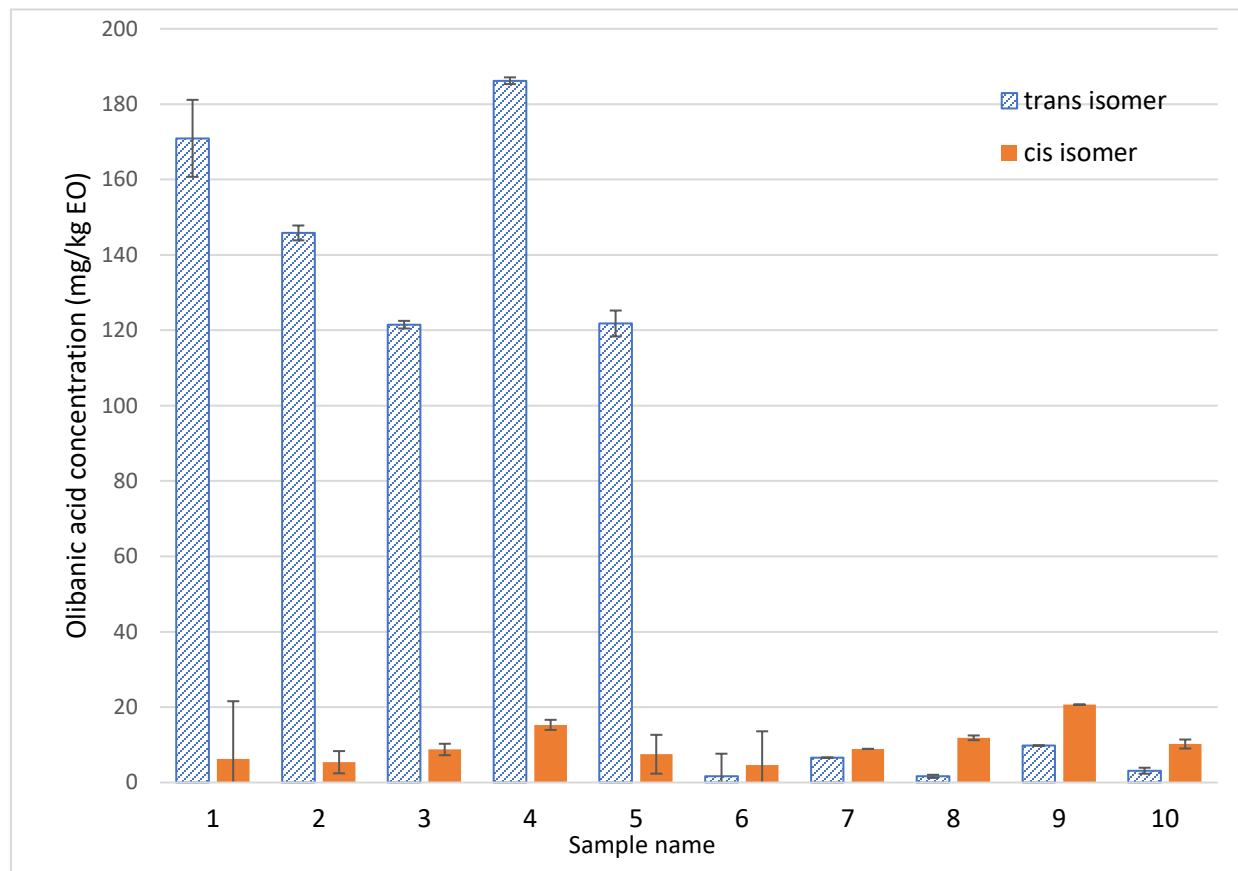


Figure 23 : Olibanic acids concentration (ppm) in *B. sacra* samples from different origins. (n=2)

II.4. Conclusion

An accurate and precise method for the quantification of olibanic acids was developed to compare their content in several samples of frankincense from diverse origins. The stable isotope dilution assay using [²H₂]- *cis*- and *trans*-olibanic acids was found to be very sensitive and allowed high throughput of samples. The method was validated after having checked linearity across a range of concentrations of calibrations curves, showing high coefficients of determination. This method was also validated by proving its accuracy, its precision and its recovery efficiencies.

A. Acknowledgements

Albert Vieille-Givaudan company is acknowledged for providing *B. sacra* gum resin samples.

This research was funded by the region Provence-Alpes Côte d'Azur. Samples supply and financial supports were also provided by Albert Vieille (Givaudan) company. We acknowledge the Université Côte d'Azur for the use of specialised laboratory facilities and assistance.

III. ÉTUDE DES ODORANTS DE *COMMIPHORA MYRRHA*

Partie basée sur la publication (en cours de préparation) :

Analytical investigations on fragrant volatile constituents from *Commiphora myrrha* essential oil

Authors: Kimberley Massei¹, Nicolas Baldovini¹

¹ Institut de Chimie de Nice, Université Côte d'Azur, CNRS, UMR 7272, Parc Valrose, 06108 Nice (France)

Abstract:

Myrrh essential oil was analyzed by GC-MS and GC-Olfactometry, and 73 compounds were identified and quantified with GC-FID analyses, representing 93% of the oil. Different fractionation and extraction techniques were used and led to the isolation and identification of several minor compounds.

Keywords: myrrh; essential oil; *Commiphora myrrha*; GC-Olfactometry

III.1. Introduction

Myrrh is a high-valued odorant gum-resin exudate from the bark of *Commiphora myrrha* trees. The resin ducts under the bark of myrrh trees allow resin to seep when it is fissured or wounded, giving the precious myrrh resin “tears” that dry and harden on the tree. *Commiphora* genus comprises over 200 species that are mainly found in Eastern Africa, and especially spread through Kenya, Somalia and Ethiopia. Several species are also found in Arabia and India, the presumed country of origin of *Commiphora spp.*

Myrrh has been used since a long time for its odorant and medicinal properties. In fact, myrrh was described as a holy oil by Hebrews and was already used as a perfumery agent. Also, Ebers papyrus dating from 1500-1700 BC, mentions the use of myrrh to embalm bodies during mummification. When burning like incense, an aromatic, balsamic, spicy fragrance emanates from *Commiphora* resin. Other species of myrrh also produce fragrant resin such as «guggul» from *C. mukul* [175], or *C. erythrea*, producing the known sweet «opopanax oil» [162,302], and *C. guidotii*, known as «scented» or «sweet» myrrh. Nowadays, myrrh, mainly from *C. myrrha*, is still used as a perfume material and often enters in the composition of many fragrances and cosmetics [25].

Several researchers already tried to characterize volatile compounds from myrrh essential oil. Hanuš et al. reported about 300 compounds among different myrrh species [172]. Characteristic terpenoids are found in *Commiphora spp.* oils, comprising several monoterpenoids (e.g. limonene, p-cymene, α -terpineol, α -pinene [303]), some diterpenoids (cembrene-A, mukulol [173]) and a high content of sesquiterpenes (germacrene B [167]), among which furanosesquiterpenes are characteristic markers for *Commiphora spp.* Furanosesquiterpenes are found in *C. myrrha* essential oil with major compounds such as furanoeudesma-1,3-diene, curzerene and lindestrene [304]·[165]·[161]·[170].

However, little research has been done about the fragrant properties of myrrh components, and very few authors reported on compounds with olfactory interest. The most complete work is from Mookherjee et al., published in 1983, where major compounds such as lindestrene and furanoeudesma-1,3-diene were identified to be responsible for the typical myrrh fragrance, with sweet, balsamic, warm and incense notes. Moreover, these authors found that curzerene was responsible for the green, woody and geranium odor of myrrh and that some minor components such as furanodienone, curzerenone and methoxyfuranodiene were responsible for the sweet coumarin-like, woody balsamic and rose-tea notes of myrrh odor, respectively [190]. Another work from Hasegawa et al., published in 2013, showed that the fresh note of myrrh was due to (E)- β -ocimene and that myrrh-like odor was attributable to the mixture of six other sesquiterpenoids. For instance, they found that floral notes of myrrh come from (Z)- α -bisabolene and α -photosantalol, that slightly pungent notes come from α -bergamotene and α -santalene, and that (E)- α -santalal and campherenol were responsible for burnt and sour- woody notes, respectively [189]. Rubegeta et al. also reported that monoterpenic compounds such as p-cymene, α -pinene, (Z)- β -ocimene, α -phellandrene, sabinene and terpinen-4-ol contribute to myrrh floral aroma [184]. Some of these compounds and their related odor are reported in **Figure 24** below. However, no details were reported about the sensorial analysis used by these authors to confirm the characterization of compounds suspected to contribute to myrrh fragrance. In addition, the methods for the identification of these odorants was also poorly described in these studies.

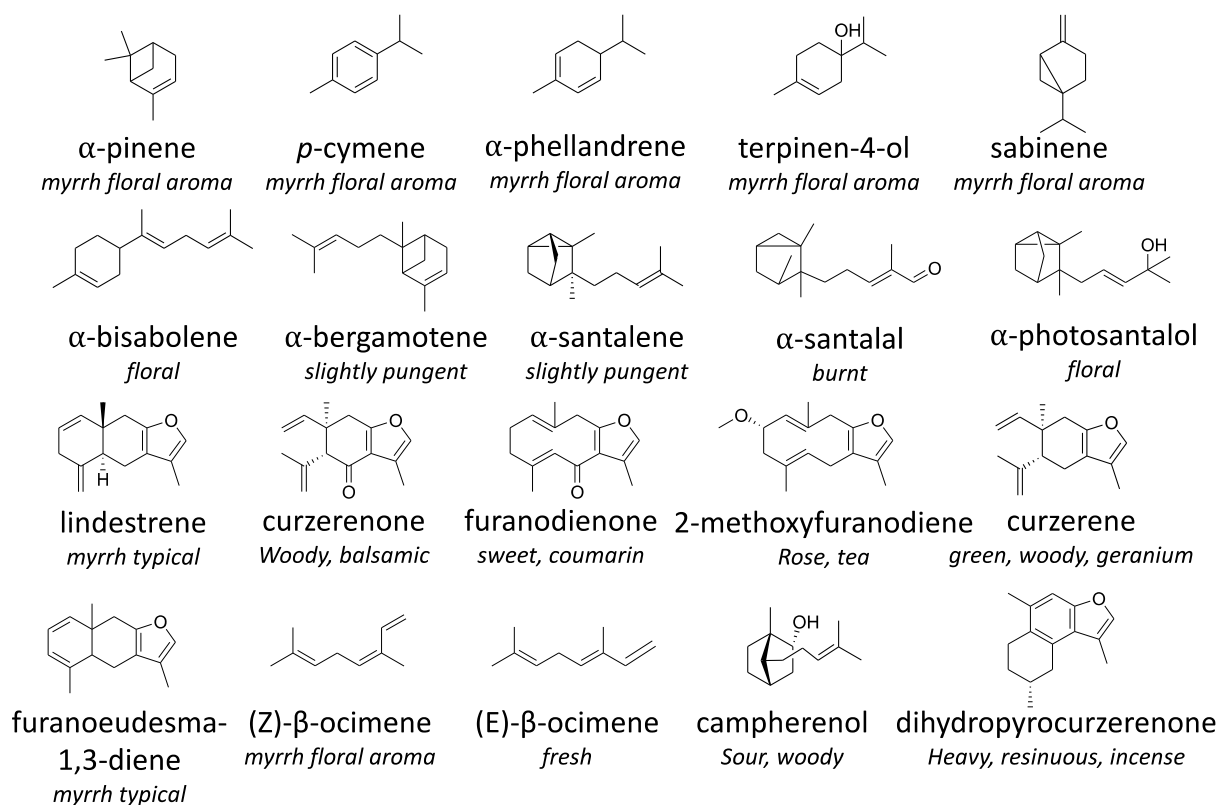


Figure 24 : Odoriferous compounds found in myrrh.

Names of compounds are written below their corresponding structure, as well as their odor, written in italic.

The aim of this study is to improve the knowledge of odor-impact constituents of myrrh through deeper analysis of volatile components, including minor and trace compounds, that could contribute to the characteristic odor this material.

III.2. Material and methods

A. Raw material and hydro-distillation

Essential oil of *Commiphora myrrha* was supplied by Albert Vieille Company (Vallauris France). The oil was obtained by hydro-distillation of gum resin samples from Somali. The essential oil was stored at room temperature and preserved in aluminum bottles.

B. GC/MS and GC/FID analyses

GC-MS and GC-FID analyses were performed on an Agilent Gas Chromatograph 6890N and a Mass Selective Detector 5973N (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) working in electron impact (EI) mode at 70 eV (scan range 35-400amu). The gas chromatograph was equipped with a fused silica capillary column HP-1 (50 m \times 0.2 mm i.d., film thickness: 0.33 μ m; Agilent Technologies). The analytical parameters were the following: the carrier gas was helium at a flow rate of 0.8mL/min. The oven temperature was programmed (program 1) from 50 to 280 $^{\circ}$ C at 3 $^{\circ}$ C/min and held isothermal for 15 min. The injector (split mode, ratio 25:1) temperature was set to 250 $^{\circ}$ C. The temperatures of the ion source and transfer line were 280 $^{\circ}$ C and 250 $^{\circ}$ C, respectively. Another program of temperature was applied with the same

parameters as above, for shorter analysis time, with the following program 2: from 50 to 280 °C at 10 °C/min and held isothermal for 10 min.

GC-MS analyses were also carried out on another GC-MS 6890N-5973 equipped with a fused silica capillary column (HP-5MS, 30 m × 0.25 mm i.d., film thickness: 0.25 µm; Agilent Technologies) and operating in the following conditions: split mode, ratio 20:1, flow rate : 1mL/min, temperature of transfer line : 250°C, injector temperature: 250°C. The oven temperature was programmed (program 3) from 50 to 280°C at 3°C/min and held isothermal up to 136.7 min, or, with another parameters (program 4) from 60°C to 250°C at 3°C/min and held 20 min. Shorter analysis (program 5) were performed with the same parameters as described above except for the following parameters : from 100°C to 200°C at 3°C/min then from 200 to 250°C at 10°C/min, held for 5 min (splitless mode, flow rate : 1mL/min). Shorter analysis for analysis of low-and semi-volatiles (program 6) were performed with the same parameters as described above except for the following parameters: from 100°C to 250°C at 5°C/min (splitless mode, flow rate : 1mL/min).

A 1.0 µL sample was injected per run. Essential oil and its fractions were analyzed as 10% solutions in toluene, when analyzed on HP-1 column, and in dichloromethane (DCM) when analysis was performed on HP-5MS column.

LRI Linear Retention indices (LRI) were determined from the retention times of a series of n-alkanes with linear interpolation. The constituents were identified by comparison of their mass spectra and LRI with those of pure compounds registered in commercial libraries (NIST20) and literature data (Adams, 2007 and others)[278], and with a laboratory-made database built from authentic compounds.

C. GC-Olfactometry FID/ Olfactometry apparatus

GC-O analyses were performed on a GC-2010 apparatus (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an automatic on-column injector AOC-20i, a flame-ionization detector, and an olfactory port OP275. Both detectors were kept at 250 °C. The detection of odors was recorded manually on an analog recorder by the panelist during the analysis. The GC was equipped with a HP-5 analytical capillary (50 m × 0.32 mm, 0.52 µm film thickness; Agilent Technologies). At the end of the analytical column, the gas stream was split in a 1/9 volume ratio by a Y-glass splitter toward the ODP and the FID using uncoated fused silica capillaries. The carrier gas was N₂/air at a constant flow rate of 1.51 mL/min. The injection volume was 1.0 µL, in splitless mode. The temperature program of the oven started at 100 °C and was heated at a rate of 5°C/min to 250 °C, and held at 250 °C 45 min. GC-O analysis of myrrh essential oil was performed by untrained panelist without any experience in the detection of the odorants, according to GC-SNIF method used for these analyses. Samples were injected as a 10% solution.

D. Essential Oil fractionation

A synthetic scheme of fractionation steps of myrrh oil is reported in the **Figure 25** below.

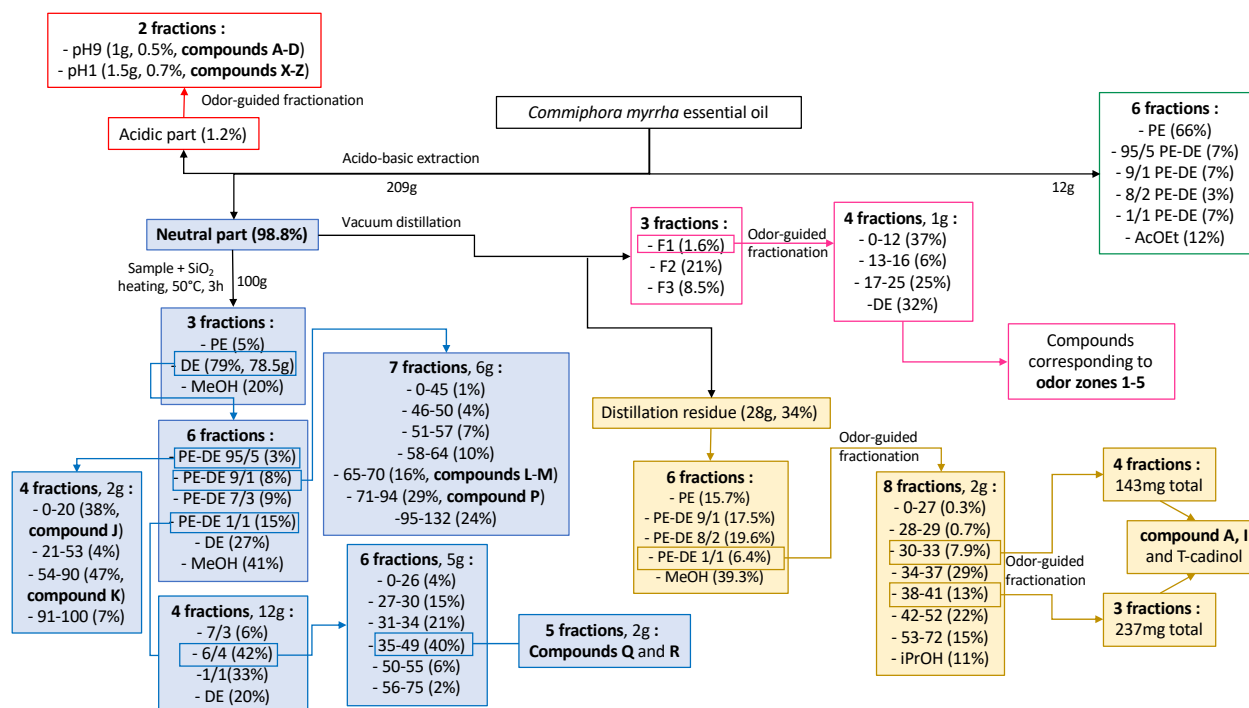


Figure 25 : Flowchart of myrrh oil fractionation steps.

A color corresponds to a type of extraction and separation step. Oil fractions are shown in green, volatile vacuum distillation fractions are in pink, distillation residue fractions in yellow, the neutral part following acido-basic extraction in blue whereas acidic part is in red. PE : petroleum ether; DE : diethyl ether; iPrOH : isopropanol; AcOEt : ethyl acetate.

D.1. Separation on column chromatography

A 12.2g sample of EO was fractionated by column chromatography, using c.a. 200g of silica gel (Kuehne-Nagel, 63-200 μm) and different ratios of Et₂O (DE)/Petroleum ether (PE) solvents for eluting compounds, and ethyl acetate (AcOEt) for washing the column. Eight fractions were obtained. The content of the chromatographic tubes was analyzed by GC-MS, and selected groups of tubes were gathered and evaporated to give five fractions.

D.2. Extraction of acidic compounds

The EO sample (209 g) was diluted in freshly distilled MTBE (ca. 700 mL) and extracted with 3 \times 600 mL of 1 M NaOH solution, by shaking cycles in a 4L-separating funnel. Basic aqueous phases were then gathered and subsequently washed with 4 \times 600 mL DCM and cooled in an ice bath. Then, 160 mL of 12M HCl solution was slowly added in the aqueous phase under agitation until it reached pH9. The aqueous phase was extracted again with 3 \times 600mL DCM, and the combined organic phases were washed with brine, filtrated on magnesium sulfate, and evaporated under vacuum. The same procedure was repeated on the remaining aqueous phase, which was acidified to pH1. Organic phases collected at both pH9 and pH1 were re-dissolved in ca. 500 μl DCM and analyzed by GC-MS on the HP-1 column. The masses of fractions obtained were c.a. 1g (for fraction «pH = 9»), and 1.45g (for fraction «pH = 1»),

The fraction «pH=1» (1g aliquot) was fractionated and gave six sub-fractions, with a PE/DE gradient of solvents, and AcOEt wash.

D.3. Artificial production of minor compounds in larger amounts

100g of the neutral part of myrrh essential oil was mixed with 280g silica gel (Kuehne-Nagel, 63-200 μm), heated at 50 °C during 3h, and used for a solid loading on a top of 1kg of SiO_2 column. The column was eluted with either PE or DE or methanol (MeOH), and 3 fractions were obtained. Compounds of the DE fraction were chromatographed on silica gel, 777g, and gave 6 sub-fractions after PE/DE elution gradient, among which 2 sub-fractions were chromatographed again on $\text{SiO}_2\text{-AgNO}_3$ (10%) with flash chromatography (PE/DE gradient), and analyzed by GC-MS analyses (program 5).

D.4. Vacuum distillation

Neutral part of myrrh essential oil (50g) was subjected to vacuum distillation, during 5h, under 10 mbar vacuum, with gradient temperature ramp from 60°C to 220°C, 5°C/10min. After having collected the first volatile head components recovered after 4h of distillation, in refrigerated liquid nitrogen bath, other fractions were collected by using a Perkin triangle for easier collect and more stable distillation conditions. Four fractions were obtained. The first fraction, corresponding to the head of distillation, was chromatographed over silica gel, and gave 4 sub-fractions, that were analyzed by GC-MS chromatography, and collected by preparative-GC when necessary, for further identification.

D.5. Isolation of low volatile minor odor-active myrrh EO compounds after fractionation of the distillation residue

The remaining residue of distillation was chromatographed on 300g silica gel, with a gradient of solvents PE/DE, and washed with isopropanol. Six fractions were obtained, and the «1-1 fraction» was the most odorant, and was subjected to GC-O and GC-MS analyses (program 6).

This fraction was fractionated again over a $\text{SiO}_2\text{-AgNO}_3$ column of 50g (PE/DE gradient), and with the help of GC-MS analyses of several tubes obtained after 1-1 column chromatography, and after evaluation on smelling strips soaked directly in the test tubes, selected tubes were gathered to obtain 8 new sub-fractions. Some of them were further separated on $\text{SiO}_2\text{-AgNO}_3$ (10%) columns (PE/DE gradient), leading to 7 fractions, among which some were subjected to preparative-GC for further compounds isolation and characterization.

Due to the low masses obtained here, several other fractionations from the myrrh neutral oil obtained by vacuum distillation and from total myrrh essential oil (c.a. 100g) were performed in the same conditions and with a similar scheme (removal of acidic compounds, of head of distillation, PE→DE gradient of elution for $\text{SiO}_2\text{-AgNO}_3$ and SiO_2 columns) in order to accumulate higher quantities of each compound. These experiments are not described here.

D.6. Flash Chromatography

The flash Chromatography Rf+ Lumen (Teledyne ISCo, Lincoln, USA) is equipped with a fraction collector. This instrument was operating with a same gradient of solvents (PE/DE), but under 2 different conditions, depending of the column size used (RediSepRf prepacked cartridge column with silica gel). For a 40g silica gel column, the flow rate was set at 40mL/min, and at 35mL/min for 24g columns. The detection wavelengths of the UV detector were set at 280nm and 254nm. Fractions were collected in 18mL or 8mL tubes.

D.7. Preparative Capillary-Gas Chromatography

Isolation of compounds were performed using an Agilent 6890 Gas Chromatograph Plus (Agilent, Santa Clara, CA, USA) coupled to a preparative fraction collector (PFC) (Gerstel, Mülheim a.d. Ruhr, Germany). The GC was equipped with a Phenomenex ZB-5 megabore capillary column (30 m × 0.53 mm; 3.0 μm film thickness). The end of the column was connected to MCS2 multiple column switching system (Gerstel), which used a pressure- controlled stream of hydrogen of 100 kPa to divert the analytes to FID and to a heated transfer line connected to PFC. The deactivated fused-silica capillary restrictors (1 m x 0.1 mm for FID connection, and 1 m x 0.32 mm for PFC connection) provide a FID/PFC ratio of ~1/9. The transfer line and the PFC were maintained at 250°C. The injected volume was 1 μL in splitless mode. The minimal oven temperature was set at 100°C, and rise up to 250°C. The method was optimized (temperature programming with holding times at a fixed temperature, pressure, flow) and modified according to the volatility and retention times of compounds in the different fractions. Cutting times to trap compounds were defined in the Software of the GC operating under Chemstation Rev A.10.02/Gerstel Maestro 1.3.8.14., allowing for accurate automated operation.

D.8. NMR apparatus

The constituents isolated in reasonably pure form were characterized by NMR analysis. All reagents and solvents were from Sigma Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). NMR Analyses were performed on a Bruker Avance (400 MHz) spectrometer (Bruker, FR-Wissembourg) at 25 °C in CDCl₃.

III.3. Results and discussion

A. GC-Olfactometry

According to the literature, several odor-active compounds of the resin such as furanosesquiterpenes and monoterpenoids contribute to myrrh typical odor [184,190,304].

In order to investigate other contributors to myrrh fragrance, we decided to perform GC-Olfactometry (GC-O) analyses, in a frequency-based approach with GC-SNIF technique [106,107,305]. In this approach, each time the panelist smells an odour is reported, and the data collected from the analyses of all panelists are summed to give an aromagram that reflects the most frequently detected impact odorants of the sample. In contrast to AEDA method, the sample is analyzed at a fixed concentration, and the number of GC-O sessions per panelist is then lower, allowing to involve larger panels and giving then a more general picture of the perception of the sample. Moreover, the dilution to threshold methods like AEDA do not necessarily reflect the importance of the contribution of an odorant contained at a concentration much higher than its detection threshold, as the intensity of the perception does not vary linearly in function of the concentration [104]. Here, GC-FID-O analyses involved ten non-trained panelists, and the resulting olfactogram is depicted in the **Figure 26** below. Thanks to its comparison with the GC-MS chromatogram, we could attribute most odor zones to a specific impact odorant.

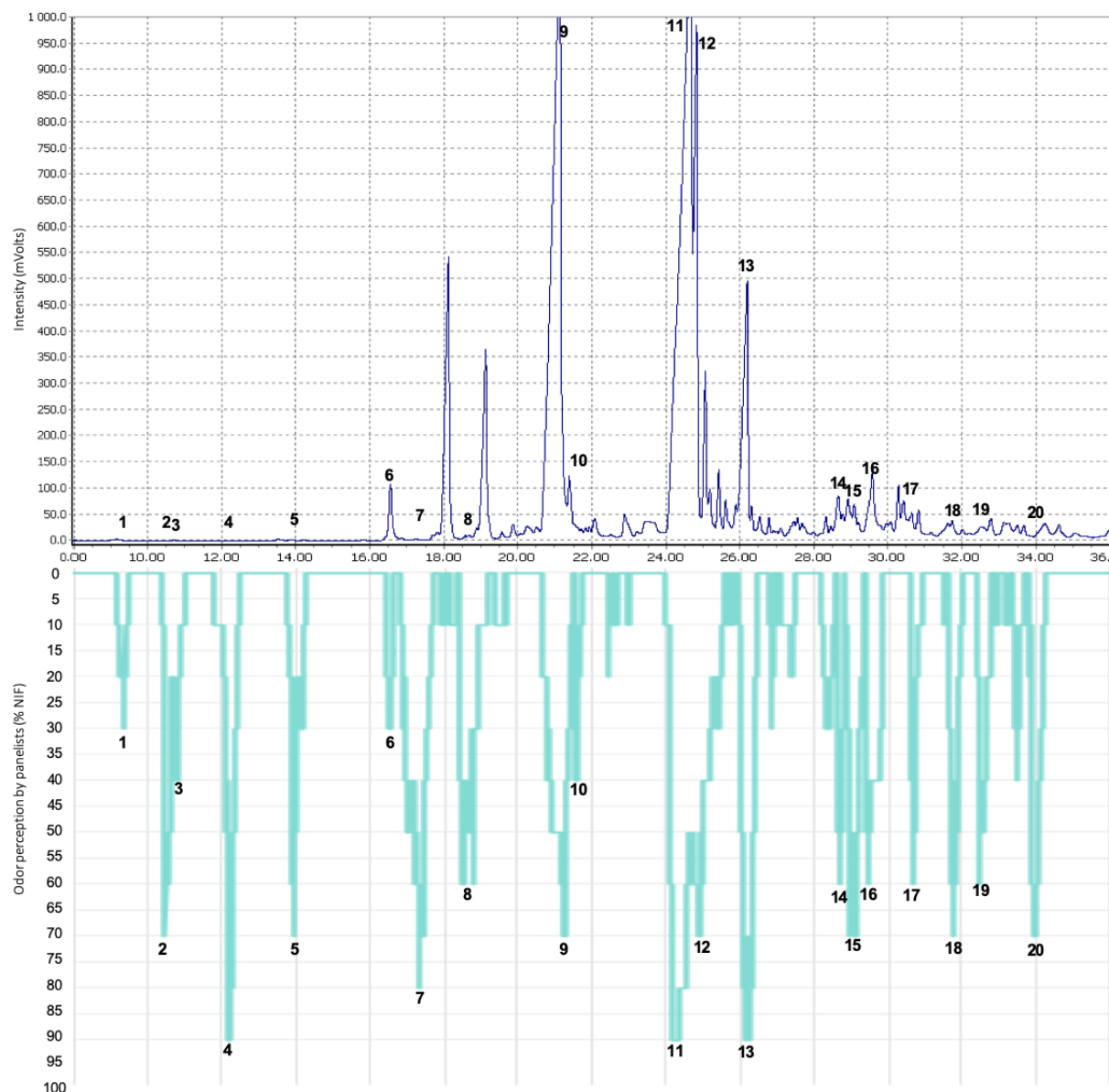


Figure 26 : GC-SNIF olfactogram of myrrh essential oil (10%).

GC-FID (upper) and GC-O (lower) chromatograms were obtained using a method based on detection frequency. Numbers correspond to a fragrance perceived by panelists, associated to a compound. The fragrances smelled are the following: 1: woody, earthy ; 2: burnt, smoked ; 3: sweet, phenolic ; 4: minty, myrrh ; 5: green ; 6: woody ; 7: coconut, sweet, almond ; 8: coconut, almond ; 9: myrrh, mushroom, green ; 10: spicy, fresh ; 11: myrrh, 12: myrrh ; 13: tea, grape, lentils 14: soap, lactone ; 15: green, hand cream, soap ; 16: sweet, floral ; 17: green, soap ; 18: green, myrrh, mushroom ; 19: sweet, pastry, almond ; 20: unpleasant, wet dog.

In this SNIF olfactogram we can distinguish three “zones” regarding odorant concentration in the oil. One zone from 6 to 15 min mostly constituted of minor highly volatile compounds (monoterpenes, alkanes, other miscellaneous compounds), with many odorants perceived, a second zone (from 15 min to 27 min) with fragrant heavier compounds such as oxygenated sesquiterpenes, and a third zone with unknown semi- or low-volatile odoriferous compounds, present as traces, eluting at the end, from 27 min to 35 min.

Odorants numbers and their respective compounds’ attribution are reported in brackets in **Table 7**.

Wilson et al. reported that methoxyfuranodiene was odorant however, in our experiments, we noticed that the odor 13 was still perceived even after the disappearance of this compound. Thus, we decided to attribute the odor zone 13 to compound (E). Moreover, Rubegeta et al. stated that α -phellandrene and terpinen-4-ol contribute to myrrh floral aroma, however, two of these very common compounds were not detected in our sample, and in our opinion, their contribution to the specific odor of myrrh is limited [184].

Moreover, among the twenty odorants perceived for most of panelists ($\geq 30\%$ NIF) twelve odorants could not be identified with certitude (odorants zones 5, 7-8,10, 13-20). The possible MS spectra of some of these odorants are provided in supplementary data (Annexe 6).

B. Myrrh Essential oil composition

Several experiments were conducted to separate compounds and to identify unknown, minor and odoriferous components from myrrh essential oil. These different ways of fractionation are reported in the flowchart provided in supplementary **Figure 25**.

B.1. Separation on column chromatography

The fractionation of the oil and the analysis of the fractions led to the identification (by LRI, MS spectra comparison and NMR characterization) and quantification of 59 compounds, representing almost 93% of oil components (**Table 7**). In this oil, unknown compounds (to which we attributed a mass spectrum) represent 2.2% of the oil, and were attempted to be isolated along fractionation and extraction steps.

By comparing our results with those of the literature, we found that the composition of our EO sample was similar to the composition of *C. myrrha* essential oil already reported by several authors [161,167]. Hence, major constituents of our oil were furanoeudesma-1,3-diene (30%), curzerene (17.4%), lindestrene (9%) and 2-methoxy-furanodiene (6%), and this composition is representative of what can be expected from of *C. myrrha* oils [172]. Actually, previous studies also reported curzerene, furanoeudesma-1,3-diene and also lindestrene as major compounds [161,169–171,188,304,306].

In contrast, some authors reported quite different major compounds in *C. myrrha*, and this species was often confused in the past. Thus, regarding to these discrepancies, Dekebo et al., and Hanuš et al. conducted novel studies to compare compositions of *C. myrrha* species and its related adulterants such as *C. erythrea*, *C. kataf* or *C. sphaerocarpa*. Dekebo et al. found that true myrrh essential oil contains furanoeudesma-1,3-diene, furanodiene, lindestrene and curzerene as major components [167], and Hanuš et al. stated that on the basis on the presence or absence of these compounds, it was possible to affirm or infirm the label of *C. myrrha* oil.

Table 7 : Constituents of the essential oil of *Commiphora myrrha*.

LRI ^a	LRI _{Litt.} ^b	LRI ^c	LRI _{Litt.} ^b	Identification + (odorant number)	Area (%)
855	851	854	855	p-xylene	0.04
886	880	-	-	o-xylene	tr
925	924	924	922	α -thujene	tr
932	932	933	930	α -pinene	tr
-	-	966	964	sabinene	tr
938	930	-	-	benzaldehyde	tr
959	951	-	-	1-ethyl-4-methyl benzene	tr
985	983	982	981	myrcene	tr

1007	1006	1006	1005	δ -3-carene	tr
1014	1006	1012	1013	o-cymene	tr
1023	1024	1022	1020	limonene	0.01
1040	1037	1037	Std	β -ocimene (1)	0.02
-	-	1105	1104	6-Methyl-3,5-heptadien-2-one (2)	tr
-	-	1111	Std	2,6-xylénol (3)	tr
-	-	1163	Std	3,5-xylénol	tr
-	-	1169	Std	menthofuran	tr
-	-	1192	Std	4-ethylbenzaldehyde	tr
-	-	1223	Std	4,7-dimethylbenzofuran (4)	tr
-	-	1236	-	Unidentified compound (5)	tr
1336	1337	1338	1334	δ -Elemene (6)	1.07
1345	-	1346	-	Unidentified compound (7)	tr
1349	1352	1351	1351	α -cubebene	0.03
1371	1370	1374	1372	α -ylangene	0.02
1376	1374	1379	1376	α -copaene	0.10
1381	1386	1383	-	β -Elemene (<i>cis/trans</i> n.d.)	0.12
1384	1381	1388	1386	β -Bourbonene	0.41
1390	1386	1391	1391	β -Elemene (<i>cis/trans</i> , compound J)	5.59
1400	1393	1405	1404	cyperene	0.07
1414	-	1418	-	Unidentified compound (8)	tr
1412	1412	1413	1413	α -gurjunene	0.04
1416	1420	1420	1428	β -Copaene	0.18
1418	1419	1422	1420	caryophyllene	0.48
1430	1431	1431	1433	γ -elemene	1.20
1434	1433	1435	1436	trans- α -Bergamotene	0.06
1437	1436	1441	1436	α -guaïene	0.02
1439	1442	-	-	guaïa-6,9-diene	0.02
1442	1442	-	-	isogermacrene D	0.09
1451	1449	1455	1454	humulene	0.26
1458	1460	1462	1459	allo-aromadendrene	0.11
1467	1470	-	-	4,5-di-epi-aristolochene	0.06
1472	1472	1473	1466	γ -muurolene	0.26
1473	1476	1480	1480	germacrene D	0.14
1473	1478	-	-	δ -selinene	tr
1476	1478	-	-	β -Selinene	0.49
1482	1482	-	-	valencene	tr
1491	1494	1488	1495	Curzerene (9)	22.41
1494	1492	1495	1495	α -Selinene	1.18
1496	1495	-	-	α -muurolene	tr
1499	-	-	-	Eudesma-6,11-diene	tr
1502	1505	1510	1511	δ -amorphene	0.30
1508	1511	1509	1507	γ -Cadinene	0.56
1512	1513	1513	1511	calamenene	0.16
1517	1514	1517	1515	δ -Cadinene	0.37
1526	1531	1532	1533	Eudesma-4(14),7(11)-diene = γ -Selinene	0.36
1531	1531	1531	1538	calacorene + eudesma-4(14),11-diene	0.39
1537	-	-	-	10-epi-elemol	0.38
1544	1540	1542	1542	Eudesma-3,7(11)-diene	0.28
1553	1544	1556	1554	germacrene B	1.54
1557	1554	1560	1557	mint oxide	tr
1564	-	1563	1587	furanoeudesma-1,4-diene	0.62
1566	1566	1568	1569	spathulenol	0.10

1571	1571	1575	1575	caryophyllene oxide	0.26	
1580	1576	1580	1590	curzerenone	0.27	
1586	1589	1587	1590	β -elemenone	0.19	
1606	1604	1607	1607	1,10-di-epi-cubenol	0.29	
1624	-	1613	1616	furanoeudesma-1,3-diene (11)	28.32	
1628	-	1630	-	Lindestrene (12)	10.72	
1630	1626	1632	1628	T-cadinol	1.85	
1639	1633	1639	1641	β -Eudesmol	0.16	
1642	1645	1645	1656	neointermedeol	0.30	
1644	1652	1645	1657	atractylone	0.49	
1649	1646	1647	-	1(10)E,4E-furanodiene	0.41	
1652	1644	1653	-	germacrol	0.12	
1664	-	1664	-	compound L	0.22	
1666	-	1672	1678	2-Methoxy isofuranogermacrene isomer	0.72	
1667	-	1666	1675	elemol acetate (compound K)	1.79	
1677	-	1677	-	compound M	0.22	
1678	1677	1680	1688	germacrone	0.34	
1683	-	1683	-	compound E (13)	tr	
1705	-	1703	1691	2-Methoxy isofuranogermacrene isomer	6.07	
1774	-	1789	-	compound I (15)	tr	
1777	-	1779	-	compound A (14)	0.03	
1791	-	1791	-	compound N	0.22	
1797	-	1798	-	compound O	0.18	
1803	-	1803	-	compound P	0.25	
1806	-	1806	-	compound F	0.04	
1814	-	-	-	2-acetoxifyuranodiene isomer1	0.15	
1818	-	-	-	2-Hydroxy-11,12-dihydrofuranodiene	0.21	
1825	-	1824	-	compound G (16)	0.08	
1848	-	1849	-	compound H (17)	tr	
1859	-	-	-	2-acetoxifyuranodiene isomer2	0.24	
1872	-	-	-	2-hydroxyfuranodiene	0.13	
1879	-	-	-	Compound R	0.12	
1915	-	1905	-	compound X	tr	
1948	-	1949	-	compound B + coelution	0.24	
1958	-	1960	-	compound C (19)	0.05	
1969	-	-	-	compound Q	0.13	
1984	-	-	-	5- α H,8- β H-eudesma-1,3,7(11)-trien-8,12-olide	0.06	
2008	-	1999	-	compound Y	0.02	
2010	-	2007	-	compound D	tr	
2021	-	2012	-	compound Z	0.05	
					Monoterpene hydrocarbons	0.03
					Sesquiterpene hydrocarbons	38.39
					Oxygenated sesquiterpenes	54.20
					Others	0.04
					Uncharacterized compounds*	2.18
					Unknown compounds	4.6
					Total identified	92.7

Linear Retention Indices determined experimentally by GC-MS on the HP-1 column^a, and on DB-5MS column^c, calculated using the homologous series of C₉-C₂₃ *n*-alkanes. Linear Retention Indices from literature and NIST20 database for HP-1^b column, and from Standard injection (Std), literature, NIST20 database or NMR for DB-5MS column^d. Relative area percentages of peaks were determined based on GC-FID analyses. tr : trace compounds with a relative area inferior to 0.01%. * compounds unidentified previously, with a MS spectrum or NMR data attributed, these are written in bold.

B.2. Extraction of acidic compounds

Secondly, due to the high diversity of compounds classes and the high percentage (14%) of oxygenated compounds found in our oil, and because phenolic and acidic compounds are known to be more able to be fragrant [104], we decided to perform an acido-basic extraction in order to deepen the identification and characterization of myrrh essential oil compounds.

We decided to separate acidic fraction into a phenolic one and a more acidic one, and we used the minimal solvent possible needed to be able to perform the acido-basic extraction without contamination of neutral compounds in the acidic part of the oil obtained. The best separation of the oil was obtained with 3 different pH. Firstly, at pH = 14, the major neutral components (lindestrene, curzerene, furanoeudesma-1,3-diene, etc.) were removed. Then, phenolic compounds were extracted (pH = 9) and finally, more acidic conditions were reached with pH = 1, and a mixture of same compounds in different proportions was obtained. GC-MS analyses (program 2) of these fractions allowed us to obtain mass spectra of unknown compounds of these fractions. Details concerning this fractionation is provided in Annexe 6.

The sum of compounds that we identified, bearing a phenol, acetate, or carboxylic acid group, represents only 2.18% of the total oil (**Table 7**). The most odoriferous part of the acidic fraction was the «pH = 1 fraction», with a phenolic-sweet odor, and seven unknown compounds from this fraction (**compounds A-D** and **X-Z**, representing 92% of acidic part) were attempted to be isolated for further characterization. Their mass spectra are displayed in Annexe 6.

However, for most of compounds detected in the acid fractions, they could not be determined due to their few amounts in the oil. **Compounds A-D** were found in both acidic and neutral parts, probably due to their amphiphilic structures. **Compound A** was isolated and analyzed by NMR spectroscopy, but its NMR characterization is still in progress.

B.3. Heat-induced increased production of minor compounds in larger amounts

By looking at GC-MS and GC-FID analyses of myrrh essential oil, we noticed that not only major myrrh compounds were odorant, but also minor ones from the «8-2 fraction» were highly fragrant, with characteristic sweet, floral and phenolic notes of myrrh oil. Since we observed fortuitously that the amount of some of these compounds increased when heated in the presence of silica gel, we decided to induce their formation by treating a sample of oil in these conditions, to facilitate their isolation for further identification and confirmation of their olfactory properties. GC-MS chromatograms of the neutral oil before thermal treatment, and in the DE fraction after thermal treatment (containing fragrant compounds in larger amounts), are shown in **Figure 27**.

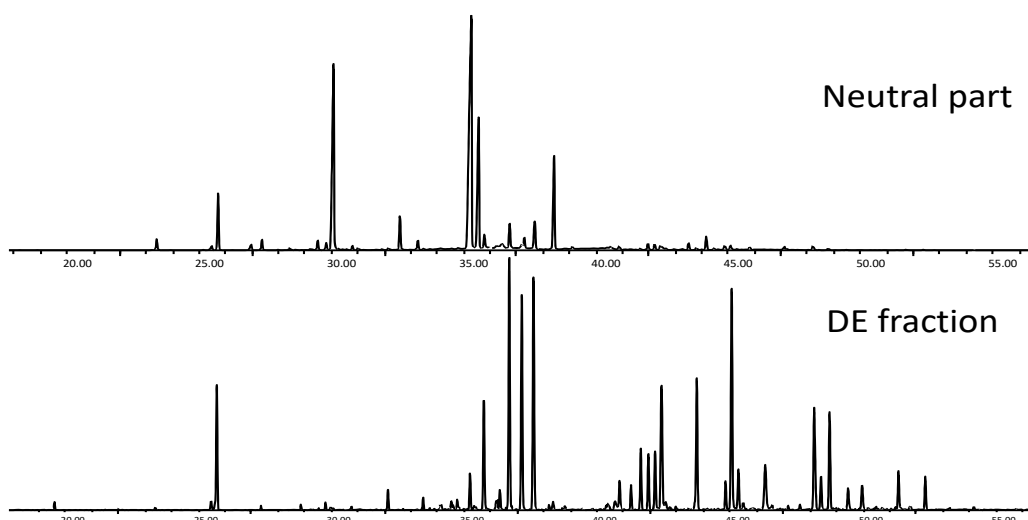


Figure 27 : GC-MS chromatograms of neutral part of myrrh oil, and DE fraction of neutral part of myrrh oil after thermal treatment.

The identification and characterization of minor compounds already present in the oil prior to thermal treatment has been attempted, due to their larger amounts compared to that in the initial oil. Despite the fact that most of floral and sweet notes were lost, we managed to isolate two additional compounds of the oil, that were characterized by NMR and GC-MS spectra. In the «95-5 fraction», one isomer of β -elemene **compound J**, and the compound elemol acetate (**compound K**) were isolated and analyzed by NMR to exactly determine their structure. **Compounds P** and **R** were also isolated and analyzed by NMR spectroscopy, because their identification was not possible based only on their LRI and their MS spectra. NMR characterization is still in progress for these compounds.

The most fragrant fraction was the «9-1 fraction», where unknown **compound I** and **compound A** (already isolated from acidic fraction) were present. In this heat-induced generated fraction, some compounds already present in the total oil before thermal degradation such as **compounds L, M, N** and **O** were also observed, and are supposed to be odoriferous compounds. However, they could not be isolated.

B.4. Vacuum distillation

In order to isolate the most volatile odor-active compounds (first part of the olfactogram), the neutral part was fractionated by distillation under reduced pressure. The first distillation fractions provided compounds corresponding to odor zones 1, 2, 3, 4 and 5.

Regarding GC-SNIF aromagram **Figure 26**, we saw that more than 70% of panelists perceived three highly volatile compounds (odor zones 2, 3, 4) eluting before fifteen minutes, and present as trace compounds in myrrh neutral oil. To isolate these intense odorants, we decided to further fractionate the distillate, but neither column chromatography or preparative GC allowed us to isolate these odorants because of their extreme volatility, their very low concentration and the chemical instability of some of them.

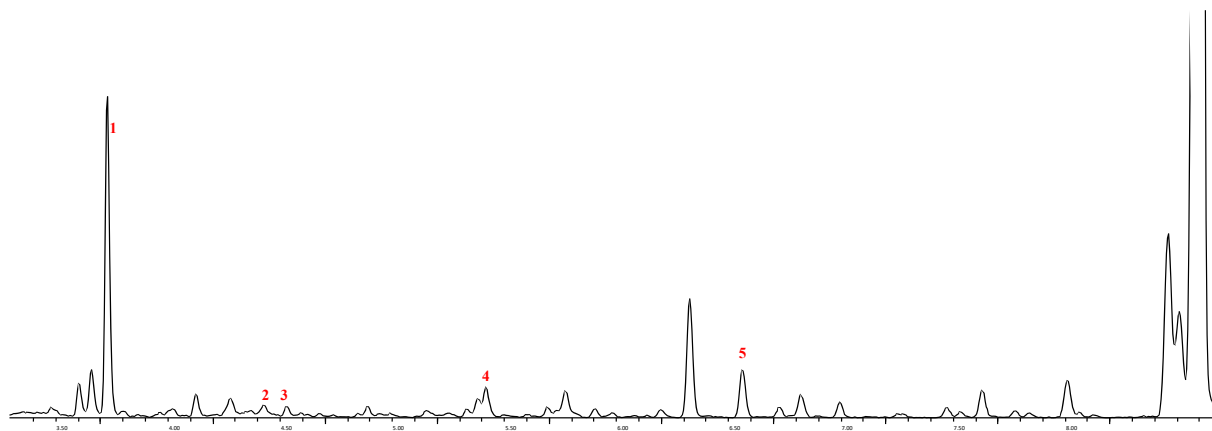


Figure 28 : GC-MS chromatogram of the head of distillation of myrrh neutral oil, fraction F1. Compounds numbers reported correspond to the odor zones from the olfactogram.

The injection of reference compounds in GC-MS and GC-O helped us to confirm the identification of five odor zones corresponding to β -ocimene (1), 6-Methyl-3,5-heptadien-2-one (2), 2,6-xylenol (3), 4,7-dimethylbenzofuran (4), δ -Elemene (6), respectively, after careful consideration of their MS spectra and retention indices (**Table 7** and **Figure 28**). Only odor zone 5 was not identified in this first fraction obtained by vacuum distillation. Thus, such highly volatile compounds as menthofuran, xylenol isomers or others, were identified in this oil and were considered to be large contributors of the overall myrrh oil odor.

The odor zone 3 corresponds to 2,6-xylenol, that has a typical phenolic, sweet odor largely contributing to overall olfactive power of myrrh. Also, the odor zone 4 corresponding to 4,7-dimethylbenzofuran was identified in this fraction, and was found to be responsible of the typical “green” note of myrrh.

B.5. Isolation of minor odor-active myrrh EO compounds after fractionation of the distillation residue

The remaining neutral residue after having separated it from the “head of distillation” fraction also had a strong characteristic myrrh-odor. Based on the aromagram built thanks to the GC-Olfactometry analyses of ten panelists, three odor-active zones were highlighted. In addition to the first odor-active zone represented by trace volatile compounds, and the second odor-active zone represented by major components of myrrh oil, the aromagram also revealed the presence of powerful odorant compounds present as minor or even as trace compounds in the oil. After several assays, the myrrh «1-1 fraction» obtained from neutral part of the oil and after the removal of acidic compounds, was fractionated in order to separate and isolate each fragrant compound (**Figure 29**).

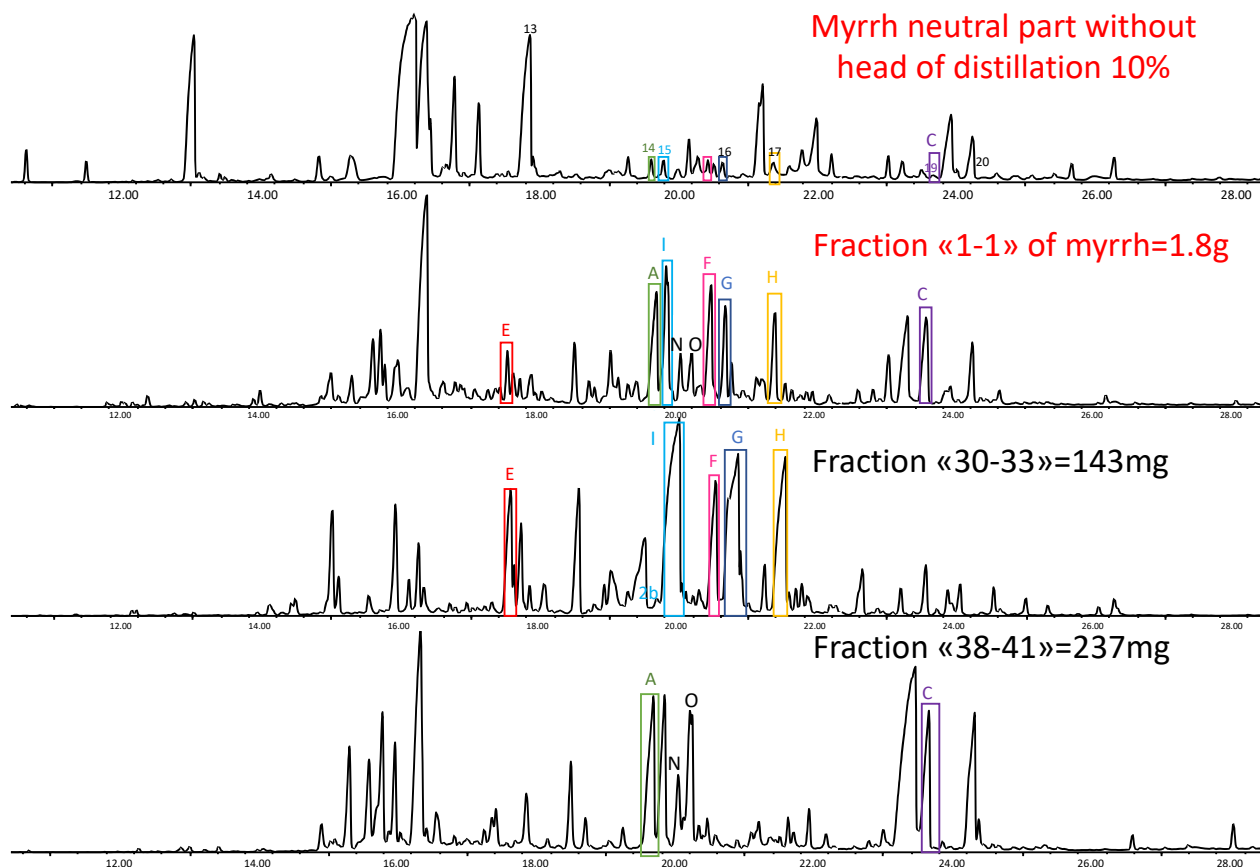


Figure 29 : GC-MS chromatograms of neutral part of myrrh oil without the head of distillation, and its most fragrant «1-1 fraction».

The two most odoriferous sub-fractions of the «1-1 fraction» are also shown below this fraction. Compounds numbers correspond to the number of odorants reported on GC-SNIF aromagram, while letters correspond to the attributed identification name of compounds.

Intense odorants correspond to **compound A**, corresponding to odor zone 14 on GC-aromagram. Other intense odorants are **compounds I, E, G** and **H**, corresponding to odor zones 15, 13, 16 and 17. The known compound T-cadinol was isolated and analyzed by NMR spectroscopy for further characterization. In addition to this compound, the **compound I**, not previously reported in myrrh, was identified and characterized by NMR spectroscopy, and corresponds to the structure below (**Figure 30**).

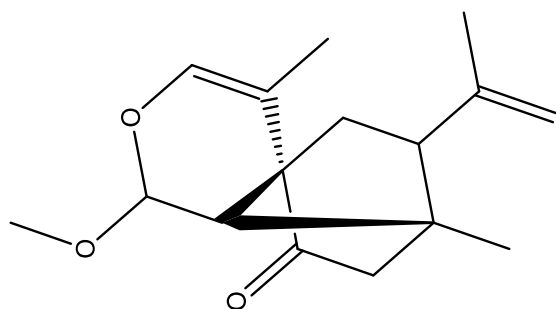


Figure 30 : Structure of compound I, determined following NMR analyses.

We report here a totally new compound, that has never been isolated before. Structurally close compounds, santonic acid and its derivatives, were discovered by Woodward et al. in the fifties, and was observed in the plant genus *Artemisia* [307,308]. NMR data and table with attributions are provided in Annexe 6.

Compound F is also strongly fragrant but its odor was hidden by other compounds, it has a mushroom-green fragrance. Possible MS spectra of odorant compounds from «1-1 fraction» are reported in Annexe 6. **Compound G** characterization by NMR analyses is in progress.

III.4. Conclusion

Myrrh essential oil is a complex oil with strong fragrant properties. However, despite the fact that most of its odor is due to its major compounds such as furanosesquiterpenes, GC-Olfactometry analyses revealed that those compounds were not the only contributors to the global myrrh aroma. Here, we managed to identify almost 93% of the oil, with the help of different fractionation and extraction steps. Five compounds that we could not identify only based on their retention indices and their MS spectra were isolated and analyzed by NMR analyses such as compounds A, I, R, P and G. Some of these analyses are still in progress to elucidate the structures of those compounds. The compound I with a fatty-soap odor was seen in myrrh species for the first time, but was already found in *Artemisia* species. In addition to these 5 compounds, 3 known compounds: T-cadinol, β -elemene (compound J) and elemol acetate (compound K) were characterized by NMR to confirm their identification. Moreover, 5 compounds: β -ocimene, 6-Methyl-3,5-heptadien-2-one, 2,6-xyleneol, 4,7-dimethylbenzofuran and δ -Elemene, were also identified for the first time in myrrh by comparison of their LRI and MS spectra of standard compounds, and those compounds are found to be responsible for the sweet floral and minty notes of myrrh. In conclusion, this work has allowed the identification and characterization of odorant compounds of myrrh essential oil, and some compounds were found in this species for the first time. Overall, these data provide new insights into the global fragrance of myrrh and its impact odorants.

IV. ÉTUDE DES ODORANTS DE *CISTUS LADANIFER*

Partie basée sur la publication (en cours de préparation) :

Analytical investigations on fragrant volatile constituents from *Cistus ladanifer* essential oil

Kimberley Massei¹, Nicolas Baldovini¹

¹Institut de Chimie de Nice, Université Côte d'Azur, CNRS, UMR 7272, Parc Valrose, 06108 Nice (France)

Abstract:

C. ladanifer essential oil was analyzed by GC-MS and GC-FID, and more than 150 compounds were identified after several steps of fractionation, accounting for 93.7% of the oil. GC-Olfactometry analyses revealed the presence of about 14 odor zones, corresponding to one or several coeluting compounds from the oil. Moreover, GC-O showed that several compounds significantly contribute to the fragrance of *C. ladanifer* essential oil.

Keywords: Rockrose; essential oil; *Cistus ladanifer*; GC-Olfactometry; odorants

IV.1. Introduction

Rockrose is an endemic species to the western Mediterranean region, known for its applications in the fields of medicine, perfumery. The valuable aromatic exudate from the leaves of *Cistus ladanifer* shrub (labdanum) has a characteristic balsamic, animal and amber scent and is used for its fragrant and fixative properties in perfume industry. The essential oil obtained from the hydro- or steam-distillation of twigs and leaves of *Cistus* plant also has several applications in perfume and aromas but also medicinal and cosmetic applications. *Cistus* genus (*Cistaceae* family), comprising about 25 species is widespread in uncultivated areas of Mediterranean region such as in the south of France, in Spain, in Sicily, Greece, Portugal or in North Africa [191,309].

The labdanum has been traditionally collected from livestock fleece on which the fragrant gum was stuck, or by whipping cistus branches and collecting the gum from whip strips [310]. The labdanum appears in the works of perfumery from the end of the 18th century, and still enters in the composition of famous perfumes such as «Miss Dior» from C. Dior or «Chypre» from F. Coty. Nowadays, the labdanum is extracted from rockrose by soaking twigs and leaves in hot (alkaline) water to remove waxes and resinous matter, and in some cases the water is then acidified to recover the aromatic labdanum gum [311,312].

The only species used in perfumery today is *C. ladanifer*, and many papers deal with the composition of cistus oil, absolute, labdanum and labdanum derivatives [196,309,313–315]. More than 300 compounds were reported since 1950, with one of the most complete work on labdanum oil published in 1998 by Weyerstahl [196]. Typical oil constituents are sesquiterpenoids such as ledene, allo-aromadendrene, viridiflorol, ledol, palustrol. The presence of ambrox is also worth to mention. Other typical volatile compounds of labdanum oil are cis-dihydrocarveol, α -pinene, trans-pinocarveol, pinocamphone, myrtenol, borneol and bornyl acetate. A group of minor constituents including carotenoid derivatives such as 2,6,6-trimethylcyclohexanone and 2,6,6-trimethylcyclohex-2-enone were also listed [192,193,195,196,208,316,317]. Heavier compounds typical of labdanum such as labdanolic and ladanic acids, ladenol, labdanol, labdane methyl esters and other labdane derivatives, phenolic acids, flavonoids, and other tannins were also found in the labdanum oil and bioextracts of labdanum [197–199,318,319].

A study conducted on the olfactory impact of *Cistus ladanifer* components showed that 2,2,6-trimethylcyclohexanone is the main compound responsible for the balsamic fragrance of cistus leaves. In addition, (Z)-3-hexen-1-ol would be responsible for the fresh and lively smell of this plant. Then, the 2,6,6-trimethylcyclohex-2-enone would be responsible in major part of the woody and balsamic odor of the rockrose, and finally the 2-phenylethanol is probably the compound responsible for a rather floral odor [208]. Whereas present in small amounts, the compound 2,6,6-trimethylcyclohex-2-enone was responsible for the woody-balsamic notes of rockrose [192].

However, the richness of the odor of *C. ladanifer* essential oil and the complexity of its composition seems to indicate that we can expect a multitude of odoriferous constituents contributing to its pleasant odor. The aim of this study is to improve the knowledge of odor-impact constituents of rockrose through a detailed investigation on the volatile compounds that could contribute to the fragrance of *Cistus ladanifer* essential oil.

IV.2. Material and methods

A. Raw material and hydro-distillation

Essential oil (EO) of *Cistus ladanifer* var. *beta maculata* was supplied by Albert Vieille Company (Vallauris France). The oil was obtained by steam distillation of the young leafy twigs of *C. ladanifer* samples collected in Spain, in the hills of the Sierra Norte, located in the Biosphere Reserve of Las Dehesas de Sierra Morena. The harvest of *Cistus* plants was assessed by experienced pickers during the summer season, and plants were distilled in February 2020. The essential oil was stored at room temperature in an aluminum bottle to preserve essential oil components from deterioration.

B. GC/MS and GC/FID analyses

GC-MS and GC-FID analyses were performed on an Agilent Gas Chromatograph 6890N and a Mass Selective Detector 5973N (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) working in electron impact (EI) mode at 70 eV (scan range 35-400amu). The gas chromatograph was equipped with a fused silica capillary column HP-1 (50 m × 0.2 mm i.d., film thickness: 0.33 µm; Agilent Technologies). The analytical parameters were the following: the carrier gas was helium at a flow rate of 0.8mL/min. The oven temperature was programmed from 50 to 280 °C at 3 °C/min. The injector (split ratio 25:1 for MS analyses and splitless mode for FID analyses) and transfer line temperatures were set to 250 °C.

GC-MS analyses were also carried out on a 6890N GC - 5973 MSD (Agilent) equipped with a fused silica capillary column HP-20 (50 m × 0.2 mm i.d., film thickness: 0.1 µm; Agilent Technologies) and operating in the same conditions as above except for the following parameters: the oven temperature was programmed from 50 to 220 °C at 3 °C/min and held isothermal for 25min, and the injector (split mode ratio 20/1) and transfer line temperatures were 240°C.

Shorter GC-MS analyses were also carried out on another GC-MS 6890N-5973 equipped with a fused silica capillary column (HP-5MS, 30 m × 0.25 mm i.d., film thickness: 0.25 µm; Agilent Technologies) and operating in the following conditions: split mode, ratio 10:1, flow rate : 1.5mL/min, temperature of transfer line : 280°C, injector temperature: 250°C, FID detector 250°C. The oven temperature was programmed from 100 to 250°C at 5°C/min.

A 1.0 µL sample was injected per run. Essential oil and its fractions were analyzed as 10% solutions in Methyl Tert-Butyl Ether (MTBE). Sub-fractions from non-carbonylated part were analyzed as 10% solutions in dichloromethane (DCM).

LRI Linear Retention indices (LRI) were determined from the retention times of a series of n-alkanes with linear interpolation. The constituents were identified by comparison of their mass spectra and LRI with those of pure compounds registered in commercial libraries (NIST20) and literature data (Adams, 2007 and others)[278], and with a laboratory-made database built from authentic compounds.

C. GC-Olfactometry FID/ Olfactometry apparatus

GC-O analyses were performed on a GC-2010 apparatus (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an automatic on-column injector AOC-20i, a flame-ionization detector, and an olfactory port OP275. Both detectors were kept at 250 °C. The detection of odors was recorded manually on an analog recorder by the panelist during the analysis. The GC was equipped with a HP-5 analytical capillary (50 m × 0.32 mm, 0.52 µm film thickness; Agilent Technologies). At the end of the analytical column, the gas stream was split in a 1/9 volume ratio by a Y-glass splitter toward the ODP and the FID using uncoated fused silica capillaries. The carrier gas was N₂/air at a constant flow rate of 1.51 mL/min. The injection volume was 1.0 µL, in splitless mode. The temperature program of the oven started at 100 °C and was heated at a rate of 5°C/

min to 250 °C, and held at 250 °C 45 min. GC-O analysis of *Cistus ladanifer* essential oil was performed by 11 untrained panelists without any experience in the detection of the odorants, according to GC-SNIF method used for these analyses.

D. Essential Oil fractionation

All the fractionation and extraction steps are mentioned in the flowchart **Figure 32**.

D.1. Separation on column chromatography

A sample of 200g of EO was fractionated by column chromatography, using c.a. 1kg of silica gel (Kuehne-Nagel, 63-200 µm) and different ratios of Et₂O (DE) /Petroleum ether (PE) solvents for compounds elution. The content of the chromatographic tubes was analyzed by GC-MS on DB-5 MS column, and selected groups of tubes were gathered and evaporated to give five fractions of several constituents. PE-DE fractions 9-1, 8/2 and 1/1 were analyzed by GC-Olfactometry analyses, for further isolation of odor-impact odorants.

D.2. Extraction of carbonylated compounds

A 30g aliquot of cistus essential oil was solubilized in 250 mL ethanol. Then, 24.6 mL acetic acid was added to the cistus oil solution, along with Girard T reagent, according to the protocol of Girard et al., slightly modified [319]. The mixture was placed at reflux under agitation for 1h30, and cooled at room temperature. After the evaporation of a part of the solvent from the reaction mixture, the mixture was added to a cool NaOH solution (0.3M, 685mL, 0 °C, under agitation). The mixture was extracted with DE. After three successive decantations, the organic layer was washed with brine, dried on magnesium sulfate and evaporated to give 23.1g of non-carbonylated fraction. The remaining aqueous layer was added with DE and HCl (12 M, 30mL) dropwise, and the mixture (pH1) was cooled in an ice bath, under agitation. The aqueous layer was extracted with DE thrice, the organic phases were gathered and washed once with 500mL of HCl (1 M), then with a saturated sodium bicarbonate solution, and finally with brine. Finally, the organic layer was dried on magnesium sulfate and evaporated to give 2.8g of carbonylated fraction. This fraction was filtrated on silica using PE/DE 8-2 for elution, followed by DCM, then isopropanol (iPrOH)), dried on magnesium sulfate and evaporated to dryness before GC-MS analysis. Both fractions were strongly fragrant. GC-O analyses were performed on both fraction for identification of odor-active compounds. Preliminary assays for extraction optimization were assessed, and non-carbonylated fractions were mixed before further fractionation, to have higher quantities of compounds (29g).

D.3. Isolation of odor-active compounds of rockrose oil after «Girard T fractionation»

The obtained non-carbonylated fraction was chromatographed on 500g silica gel, with a gradient of solvents PE→DE. Five sub-fractions were obtained and analyzed with GC-MS and GC-O analyses.

The sub-fraction PE/DE 85-15 was fractionated on 40g SiO₂ (Interchim puriflash® prepacked column, 50 µm) through flash chromatography, and 5 sub-fractions were obtained. The sub-fraction PE/DE 9-1 was fractionated on 300g silica gel. Fourteen sub-fractions were obtained. Among them, fractions F and G were fractionated on silica gel, with flash chromatography, on prepacked columns (Interchim puriflash® 50 µm).

Fraction F gave 3 sub-fractions, and its sub- fraction 35-46 was chromatographed for further fractionation on 25g SiO₂-AgNO₃ (Silicycle, Spherical silica gel 90A, 25 µm), with flash chromatography. This

fractionation gave 5 fractions. Fraction G was fractionated over 80g SiO₂ to give 2 sub-fractions, chromatographed over 100g SiO₂-AgNO₃ (25 μm), leading to 5 sub-fractions. Fraction H and I were fractionated on 25g SiO₂-AgNO₃ (25 μm) and gave 6 and 5 sub-fractions, respectively.

GC-O was assessed on «9-1 of non-carbonylated part of 8-2 fraction» and on the six most odorant of its sub-fractions D, F, G, H, I, K. Other GC-O analyses were performed on sub-fractions «8-34» and «35-46» from fraction F, on sub-fractions «49-54», «55-63» and «64-72» from fraction G, on sub-fractions «28-36», and «37-44» from fraction H, and on sub-fractions «33-37», «38-41» and «42-48» from fraction I.

The obtained carbonylated fraction was chromatographed on 40g SiO₂ with flash chromatography, giving 7 sub-fractions.

D.4. Flash Chromatography

Combiflash® RF+ Lumen (Teledyne ISCO, Lincoln, Nebraska, USA) was used for automated flash chromatography. The apparatus was equipped with an automated fraction collector triggered by the signal given by the ELSD detector. Solvents used were PE→DE, (iPrOH wash), wavelengths were set at 280nm and 254nm. Hand-made or prepacked column were used for routine analysis and sample fractionation. Prepacked column of 40g loaded with the sample were ran at a flow rate of 40mL/min.

E. NMR apparatus

All reagents and solvents were from Sigma Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). NMR Analyses were performed on a Bruker Avance (400 MHz) spectrometer (Bruker, FR-Wissembourg) at 25 °C in CDCl₃ or acetone-d₆.

IV.3. Results and discussion

A. Odor-impact odorants from *C. ladanifer* var. *beta maculata*

In order to investigate other contributors to *Cistus ladanifer* oil fragrance, we decided to perform GC-Olfactometry (GC-O) analyses, in a frequency-based approach with GC-SNIF technique [106,107]. Each odor smelled by the GC-O analyst is reported, and the sum of all data collected is assembled in the aromagram of *Cistus ladanifer* essential oil (10%) (**Figure 31**). Here, GC-O analyses involved eleven non-trained panelists. The corresponding GC-FID chromatogram is also represented on the figure with the aromagram, in order to attribute a compound to a specific odorant of impact. No odor perceived correspond to 0% NIF and here, an odor perceived by the whole panel will be 100% NIF.

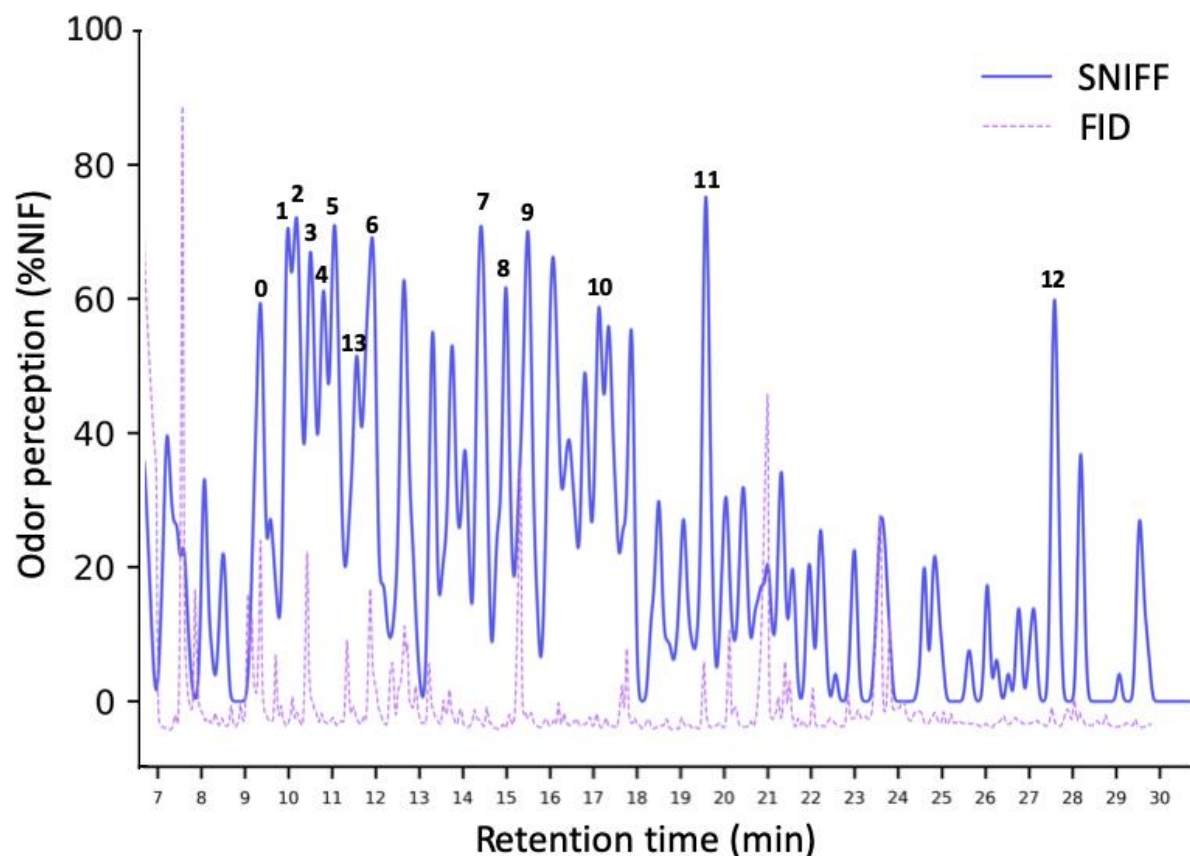


Figure 31 : GC-SNIF olfactogram of *Cistus ladanifer* var *beta maculata* essential oil (10%).

Numbers correspond to a fragrance perceived by panelists, associated to a compound. The fragrances smelled are the following: 0 : citrus, lemony, typical; 1 : manure, burnt; dung; 2 : terpenic; ferrous; plastic; sweet; 3 : sausage; seaweed; talcum powder; 4 : strong rubber; asphalt; cracked tire; 5 : burnt plastic; earthy; mushroom 6 : strong herbal; sweet plant 7 : floral; citrusy; bug; fruity; 8 : applesauce; cinnamon; cooked strawberry 9 : fruity; lipstick; floral; 10 : clove; 11 : old; citrus; honey; 12 : man perfume, woody; 13 : green leaf, ocean, herbal.

As we can see in the olfactogram above, at least 50% of panelists smelled odors between 9min and 20 minutes with this GC-O method of analysis. Most of odor zones correspond to trace compounds, even not quantifiable in our oil at the concentration fixed for the analysis. For instance, some odor zones between 10-12min and 13-15min and especially between 15.5 and 18minutes could correspond to minor or trace compounds, that could not be identified without further fractionation of the total oil.

Odorants numbers and their respective compounds' attribution are reported in brackets in **Table 8**.

B. *C. ladanifer* essential oil composition

Several experiments were done to separate compounds and to identify odoriferous components from *Cistus ladanifer* essential oil. These different ways of fractionation are reported below in the **Figure 32**.

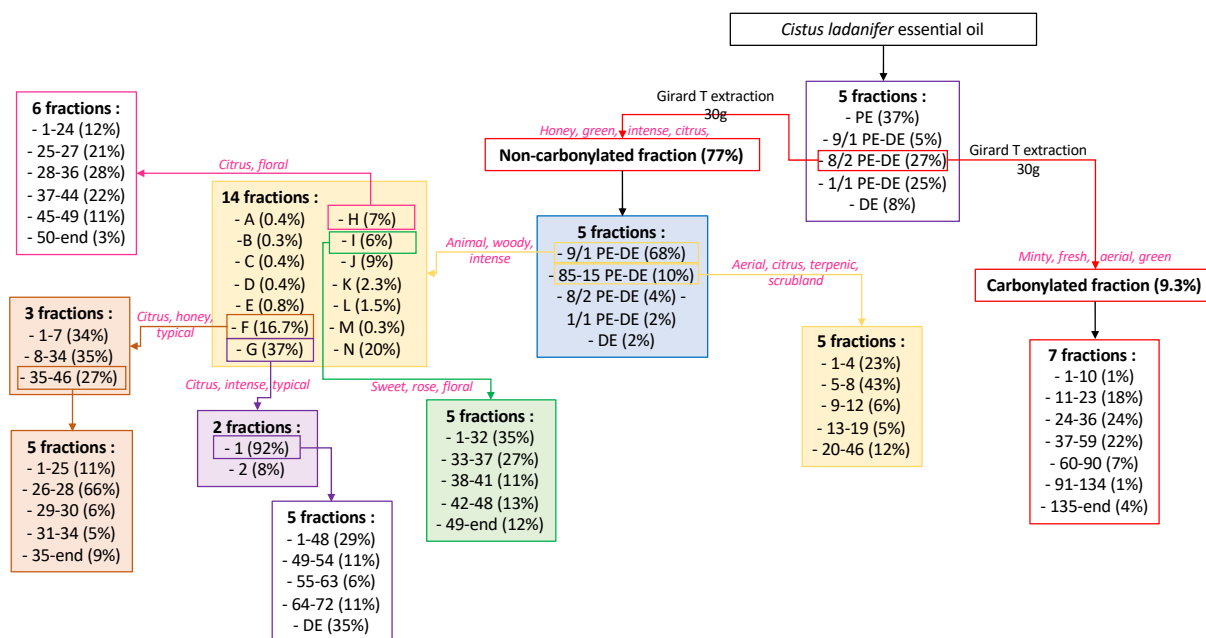


Figure 32 : Flowchart representing the different steps of fractionation of *C. ladanifer* essential oil. Odor notes of the fractions are written in pink italic.

The analysis of the oil and its five fractions, led to the identification and quantification of 150 compounds by GC-MS and GC-FID analyses, representing 92% of oil components identified (**Table 8**).

By comparing our results with those of the literature, we found that the composition of our EO sample was similar to the composition of *C. ladanifer* essential oil leaves already reported by several authors, such as Simon-Fuentes et al., Robles et al. [195] and Mariotti et al [193]. We found major constituents of the oil as already reported with α -pinene, camphene, ledene, bornyl acetate but also 2,2,6-trimethylcyclohexan-1-one, m-cymene, pinocarveol and limonene.

Moreover, samples can vary and several chemotypes can also be found for rockrose, with a predominance of viridiflorol, ledol and trans-pinocarveol found as major components for the other chemotype. Actually, Robles et al. showed intraspecies quantitative variation among cultivars such as in *C. ladanifer* var. *maculatus* compared to *C. ladanifer* var. *albiflorus*. They also showed that these differences were not due to environmental factors, nor due to geographical location. This shows the high variability of a same rockrose species but from different cultivars.

Depending on the part of *C. ladanifer* extracted and the extraction process, the composition of *C. ladanifer* can also be different. For instance, labdanum oil mainly contain ledene, allo-aromadendrene, viridiflorol as volatile compounds but also contain a higher quantity of diterpene and labdane derivative [196].

For compounds that we did not managed to isolate, a mass spectrum was proposed.

Table 8 : Constituents of the essential oil of *Cistus ladanifer*.

LRI ^a	LRI Litt. ^b	LRI ^c	LRI Litt. ^b	Identification + (odorant number)	Area (%)
884	-	-	-	styrene	0.15
924	922	1026	1012	α -tricyclene	0.88
927	926	-	-	α -thujene	0.15
936	936	1565	1568	benzaldehyde	tr
937	934	1041	1025	α -pinene	32.53

946	945	1079	1061	fenchene	0.12
948	947	1090	1069	camphene	4.90
951	947	1148	1131	thuja2,4(10)-diene	1.03
964	966	1342	1362	sulcatone	0.04
966	963	1128	1113	geranic oxide	0.08
968	968	1141	1122	sabinene	0.11
973	973	1131	1110	β -pinene	0.44
980	977	1250	1248	2-pentylfuran	tr
-	-	1179	1169	β -myrcene	tr
982	983	1232	1237	(E)-dehydroxylinalol oxide	0.09
983	-	1195	-	unknown compound A	0.22
987	-	1240	-	1,3,8-p-menthatriene	0.27
995	995	1265	-	(Z)-dehydroxylinalol oxide	0.05
997	1002	1240	-	1,5,8-p-menthatriene	0.369
999	999	1186	1168	α -phellandrene	0.27
1011	1011	1203	1179	α -terpinene	0.80
1014	1012	1298	1277	<i>m</i> -cymene	2.73
1017	1013	1352	1336	2,2,6-trimethylcyclohexan-1-one	2.96
1021	1021	1234	1209	β -phellandrene	0.54
1022	Std	1235	1217	eucalyptol	0.21
1023	1024	1223	1215	limonene	1.68
1027	1032	1330	1310	<i>o</i> -cymene	0.07
1028	1029	1251	1235	β -ocimene	0.03
1032	1022	1453	-	cyclohexanol, 2,2,6-trimethyl-	0.13
1035	Std	1312	-	acetophenone	0.06
1039	1040	1439	-	2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-one	0.35
1051	1050	1270	1245	γ -terpinene	1.28
1057	-	1485	-	2,4,4-trimethyl-2-cyclohexen-1-one	0.01
1059	1061	1353	-	pinol	0.55
1070	-	1392	-	α -campholenal	0.39
-	Std	1395	1367	rose oxide (trans)	tr
1075	1074	1469	1455	<i>p</i> -cymenene	1.86
1076	1076	-	-	6-methyl-3,5-heptadiene-2-one	tr
1078	1080	-	-	fenchone	tr
1081	1079	1309	1283	terpinolene	0.58
1083	1084	1418	1388	nonanal	0.19
1084	-	-	-	unknown compound B	tr
1085	1085	1488	1498	linalool	0.32
1086	1088	1627	1613	trans- β -caryophyllene	0.29
1087	1093	-	-	2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexanone	tr
1095	-	-	-	unknown compound C	tr
1097	Std	1378	1350	rose oxide (cis)	0.15
1099	1095	1374	-	1-methyl-2-(1-methylpropyl)-benzene	0.10
1099	-	-	-	unknown compound D	Frac
1102	1100	-	-	fenchol	tr
1102	Std	-	-		
1102	1103	-	-	chrysantenone	tr
1106	1107	1526	1511	γ -campholene aldehyde	0.60
1115	1122	1541	1520	3-nonen-2-one	0.67
1119	-	1277	-	unknown compound E	0.02
1123	1125	1563	1543	camphor	0.19
1125	1123	1521	1517	(E)-tagetone	0.14
1127	1126	1690	1690	pinocarveol	2.3

1131	1136	1521	1517	(Z)-tagetone	0.13
1132	1140	1753	1725	phellandrene-8- α -ol	0.29
1138	1137	-	-	nerol oxide	tr
1140	1144	1561	1534	(E)-pinocamphone	0.40
1141	1140	1613	1590	pinocarvone	0.81
1147	1148	1692	1698	1,5- <i>p</i> -menthadien-8-ol	0.15
1149	1149	1734	1718	borneol	0.30
1152	1153	1592	1566	(Z)-pinocamphone	1.55
1161	1161	1878	1875	<i>p</i> -cymen-8-ol	0.14
1164	1162	1633	1628	terpinen-4-ol	0.97
1171	1169	1675	1648	myrtenal	0.65
1173	1173	1723	1712	α -terpineol	0.33
1178	1178	-	-	neodihydrocarveol	0.09
1180	1180	1826	1804	myrtenol	0.52
1182	1191	1759	1730	verbenone	0.47
1192	1191	1656	1633	carvomenthenal isomer1	0.06
1194	1192	1656	1633	carvomenthenal isomer2	0.06
1197	1197	1663	1638	β -cyclocitral	tr
1198	1195	1864	1854	(E)-carveol	0.21
1206	1206	1692	1690	(Z)-ocimenone	0.48
1207	1207	-	-	fenchyl acetate	tr
1209	1208	1895	-	cis-carveol	0.11
1213	1215	1831	1814	cuminaldehyde	0.09
1214	1213	1725	1726	(E)-ocimenone	0.07
1216	Std	1779	1749	carvone	0.27
1221	1221	-	-	carvotanacetone	tr
1228	1232	1774	1763	piperitone	0.04
1230	1226	-	-	carvenone	0.03
1234	1236	1868	1861	geraniol	0.11
1242	1242	-	-	neral	tr
1244	1240	1886	1866	methyl dihydrocinnamate	0.04
1251	1250	1770	1770	phellandral	0.16
1258	1258	-	-	terpinen-7-al	tr
1267	1266	2140	2164	thymol	0.01
1271	1270	1616	1625	bornyl acetate	3.38
1275	1270	2211	-	<i>p</i> -cymenol isomer	0.07
1276	1283	2242	2233	carvacrol	0.16
1281	1281	1683	1682	(E)-pinocarvyl acetate	0.14
1293	1298	1712	-	(Z)-pinocarvyl acetate	0.10
1301	1304	-	-	hydrocinnamic acid	0.05
1306	1306	1722	1720	myrtenyl acetate	0.31
1311	1315	-	-	piperitenone	0.04
1315	1316	1765	1759	carveyl acetate	0.08
1328	Std	2209	2200	eugenol	0.24
1339	1336	1790	1751	dehydro-ar-ionene = TDN	0.08
1345	1350	2293	2279	decanoic acid	0.03
1351	1350	1483	1460	α -cubebene	0.06
1358	1361	1778	1762	geranyl acetate	0.07
1370	1370	1512	1523	α -ylangene	0.15
1373	1375	1517	1522	cyclosativene	0.42
1378	1376	1524	1522	α -copaene	0.36
1380	-	-	-	isolekene	0.48
1394	1391	1564	1575	sativene	0.04

1397	-	1857	1854	dihydro- α -ionone	0.07
1413	1410	1564	1558	α -gurjunene	0.10
1421	1422	1636	1632	caryophyllene	0.16
1437	1448	1669	-	(Z)-muurola-3,5-diene	tr
1443	1439	1641	1620	aromadendr-1-ene	0.62
1443	-	-	-	cubeb-11-ene	0.06
1449	-	1694	-	(E)-muurola-3,5-diene	0.06
1462	1459	1686	1649	<i>allo</i> -aromadendrene	0.95
1471	1472	-	-	cadina-1(6)4-diene	0.13
1472	1473	1760	1725	γ -muurolene	0.14
1485	1483	1763	1765	β -selinene	0.13
1490	1492	1518	1532	(E)- β -guaiene	0.68
1496	1493	1736	1736	ledene	4.57
1509	1510	-	-	γ -cadinene	0.07
1512	1513	1874	1844	calamenene	0.15
1516	1519	1792	1772	δ -cadinene	0.60
1520	1522	2069	-	zonarene	0.05
1527	1524	-	-	cubenene	0.11
1531	1538	1963	1960	α -calacorene	0.34
1542	1542	2172	2174	3-Hexen-1-ol, benzoate, (Z)-	0.08
1544	-	2006	-	β -calacorene	0.07
1566	1571	1975	1953	palustrol	0.33
1568	1568	2167	2153	spathulenol	0.22
1574	1575	2012	1990	caryophyllene oxide	0.08
1587	1584	2132	2103	viridiflorol	1.74
1588	-	2098	2082	cubeban-11-ol	1.73
1598	1597	2079	2062	ledol	1.39
1614	-	2193	2177	muurola-4,10(14)-dien-1 β -ol	0.10
1618	1614	2111	2088	1- <i>epi</i> -cubenol	0.10
1629	1628	-	-	tau-muurolol	0.08
1631	1626	-	-	δ -Cadinol	0.05
1639	1634	-	-	β -Eudesmol	0.11
1640	1640	-	-	α -cadinol	0.06
1658	1655	2279	2256	cadalene	0.18
1675	-	-	-	10-nor-calamenen-10-one	0.07
1734	-	2191	-	13,14,15,16-tetranorlabdan-8-ol	tr
1754	Std	2238	2199	ambrox	0.21
1782	-	-	-	6-acetoxy-11-nor-drim-7-en-9-one	0.08
1805	1803	1998	1971	15-nor-labd-8(17)-ene	0.13
1812	1811	1994	1969	15-nor-labd-8-ene	0.10
1835	1836	1930	1920	neophytadiene	0.13
1837	-	2053	-	15-nor-labd-7-ene	0.09
1880	-	2222	2223	sclareol oxide	0.18
1962	-	2290	2330	labda-8(20),12,14-triene	0.10
1978	-	-	-	isosclareolide	0.06
1991	1992	2427	2346	8 α ,13-epoxylabd-14-ene	0.02
2068	-	2513	-	2-nonadecanone	0.07
2083	-	-	-	geranyl-3-phenylpropanoate	0.12
2163	-	-	-	labd-8(20)-en-15-ol	0.11
2171	-	-	-	labd-8-en-15-ol	0.17
2248	-	2300	-	tricosane	0.08
Monoterpene hydrocarbons					50.1
Oxygenated monoterpenes					18.3

Sesquiterpene hydrocarbons	10.8
Oxygenated sesquiterpenes	6.1
Diterpene hydrocarbons	0.1
Oxygenated diterpenes	1
Others	7.3
Unknown compounds	7
Total identified (%)	93.7

Linear Retention Indices determined experimentally by GC-MS on the HP-1 column^a, and on HP-20 column^c, calculated using the homologous series of C₉-C₂₃ *n*-alkanes. Linear Retention Indices from literature and NIST20 database for HP-1^b column, and from Standard injection (Std), literature, NIST20 database or NMR for HP-20 column^d. Relative area percentages of peaks were determined based on GC-FID analyses. tr : trace compounds with a relative area inferior to 0.05% were not reported.

C. Isolation of minor odor-active components after extraction and fractionation of *C. ladanifer* essential oil

The DE and 8-2 fractions of the oil were the most odoriferous ones. According to GC-O analyses, these fractions were closer to the total cistus oil fragrance compared to other fractions, with and honey, citrus, balsamic odor for 8-2 fraction and more animal, intense and amber notes for DE fraction. To obtain and isolate odor-active minor components, we decided to fractionate the 8-2 fraction of the oil.

The total oil contains around 7% of carbonylated compounds and the 8-2 fraction was the richest in those compounds. Thus, for a better separation of constituents of this fraction, the Girard T reagent allowed us to separate aldehydes and ketones from other non-carbonylated compounds.

Both non-carbonylated and carbonylated fractions have strong odoriferous compounds, each contributing in its own way to the overall smell of the cistus. Some compounds were found in both fractions, such as acetates (myrtenyl acetate, bornyl acetate, geranyl acetate...) or 2,2,6-trimethylcyclohexanone in which the ketone group is hindered. Except these compounds, the other constituents were successfully splitted into one or the other fraction. After sensorial analyses on fragrance test strips soaked in both fractions, we found that non-carbonylated fraction possesses a stronger fragrance than the carbonylated one, with honey, green, warm, intense and citrus notes, while carbonylated fraction was sweeter with minty, aerial, fresh notes. The GC-MS chromatogram of non-carbonylated and carbonylated fraction are represented in **Figure 33**, where the odor zones are indicated by a number above the corresponding peak.

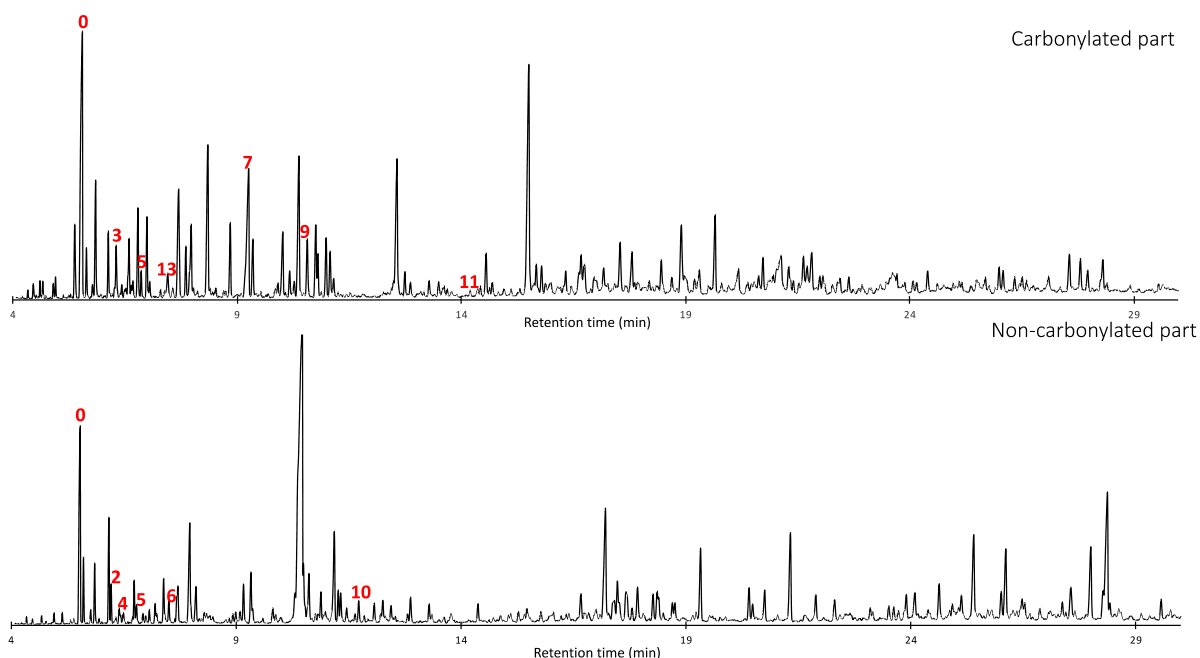


Figure 33 : GC-MS chromatograms of *C. ladanifer* carbonylated and non-carbonylated fractions. Fragmentation: 70 eV. Compounds numbers corresponding to a specific odor defined in Figure 1 are written in red above each peak.

To deepen the research of odor-impact odorants of cistus oil, the fractionation of both carbonylated and non-carbonylated fraction was pursued through several column chromatographies. The odor-active components were followed by evaluation of the fractions on smelling strips and GC-O analyses all along fractionation steps.

The sub-fraction 9-1 from the non-carbonylated fraction was the most odorant, and thus, was fractionated to give 14 fractions among which F, G, H, and I had the most the typical cistus oil fragrance. Those ones were selected and again fractionated in order to concentrate and separate the odorants along fractionation steps.

By comparing GC-O analyses results, we managed to associate an odor (numbers in **Figure 31** and **Figure 33**) to a supposed compound. The correspondences are reported in **Table 9**.

Table 9 : Supposed compounds responsible of odor zones of *C. ladanifer*.

Number ^a	Supposed compound	Detection frequency (%) ^b	Identification
0	2,2,6-trimethylcyclohexanone	64	LRI, MS
1	pinol	73	LRI, MS
2	unknown compound B	73	LRI, MS
3	unknown compound C	73	LRI, MS
4	unknown compound D	64	LRI, MS
5	chrysanthenone ; rose oxide	73	LRI, MS ; LRI, MS, Odor, Std
6	Tagetone ; nerol oxide	73	LRI, MS
7	carvone ; cuminal	73	LRI, MS, Odor, Std; LRI, MS
9	Myrtenyl acetate ; pinocarvyl acetate	73	LRI, MS
10	Eugenol	64	LRI, MS, Odor, Std
12	ambrox	64	LRI, MS, Odor, Std
13	α -campholenal	50	LRI, MS, Odor

^a Peak number according to **Table 8**, and odor description according to **Figure 31**. ^b Detection frequency over 11 judges. Std: confirmed by standard injection, LRI: confirmed by Linear Retention Indices, MS : confirmed by Mass Spectrometry, Odor : confirmed by GC-Olfactometry analyses with standard compounds.

In order to determine which of these odors contribute most to the overall fragrance of the *Cistus ladanifer* oil, we looked at those smelled by at least 7 out of 11 panelists (63% NIF).

Some of these supposed identifications of odoriferous compounds were confirmed (or infirmed) by direct standard injection. For instance, the coelution between eucalyptol and 2,2,6-trimethylcyclohexanone let us think that eucalyptol could also contribute to rockrose fragrance, however, after the injection of the standard compound, we deduced that eucalyptol was not contributing to the oil fragrance due to its low odor intensity, even at a higher concentration than in the oil.

The compound 2,2,6-trimethylcyclohexanone (**0**) was in relatively high amounts in the oil, and was reported with a citrusy-typical cistus odor by the panelists. This compound was found in both carbonylated and non-carbonylated fraction, and is one of the rare ketonic compounds which could not be extracted totally by the treatment with the Girard T reagent. However, thanks to its large amount, it was easily identifiable all along the fractionation steps, especially in fractions E to H from carbonylated part of *cistus* oil. As already described in literature, this compound is a key contributor to global *cistus* fragrance. Then, as a coeluting compound, eucalyptol was found in more polar fractions such as in fractions I and J, and certainly contribute to the citrusy, herbal, sweet and minty fragrance perceived in the GC-O analyses of these fractions.

A pungent manure-like smell was perceived by panelists after GC-O analysis of the oil. However, this compound was not smelled in 8-2 fraction of the oil, and, after comparison of the fractions where the odor zone was smelled (in 1-1 and DE fractions) and the fraction where the odor zone disappeared, the compound pinol was supposed to correspond to the odor zone (**1**). A clear correspondence between odor zone (**2**) and a compound was not established, however, after GC-MS analyses of several fractions, we deduced that this compound could correspond to unknown compound B, coeluting with terpinolene. Its supposed MS spectrum is provided in Annexe 7.

This supposed odor attribution should be confirmed by GC-O analysis of the standard compound.

In the essential oil of cistus, two campholenic aldehyde isomers were identified: the first one as γ -campholenic aldehyde (fencholenic aldehyde), and the second one as α -campholenic aldehyde. Along fractionation steps, another compound, with a MS spectrum similar to those aldehydes, was found and supposed to be responsible of odor zone 3 (salty, sausage, seaweed smell), and was suspected to correspond to unknown compound C, with a similar MS spectrum highly similar than that of campholenic aldehyde. A standard injection or the compound isolation is needed to confirm the identification.

Unknown compound D, associated to “asphalt, rubber notes”, was only found in some fractions of the non-carbonylated part. These fractions where the odor zone was perceived were compared with a sub-fraction of fraction G, where the odor zone **(4)** was not present (**Figure 34**).

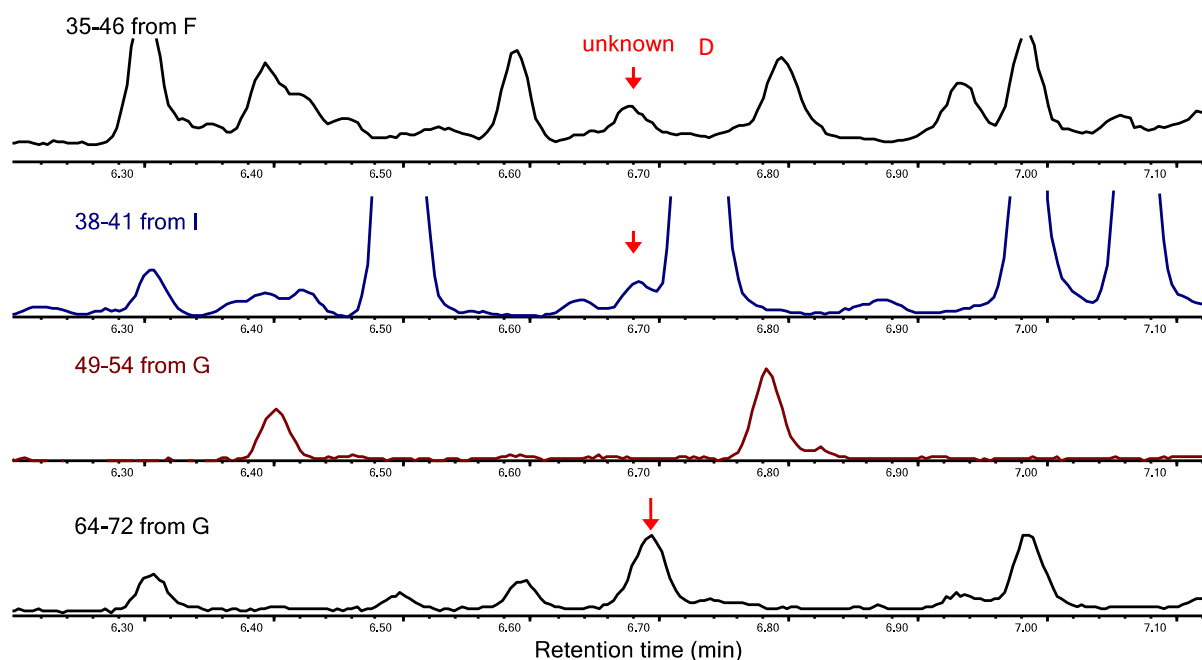


Figure 34 : GC-MS chromatograms of *C. ladanifer* fractions.

Fragmentation: 70 eV. Unknown compound D, listed in **Table 9** is attributed to the odor zone **(4)** (**Figure 31**).

Odor zone **(5)** was perceived as a unique odor by panelists, but with two distinct notes, from one analysis to another. This is the sign of co-eluting compounds, resulting in the perception of two different odors, at one moment. In this case, the odor zone is perceived as the sum of both odors, however, in most cases, one is judged by the panelist to be predominant over the other. One note smelled by panelists correspond to a mushroom, earthy, herbaceous note whereas the other note was mostly described as burnt plastic. With the separation of non-carbonylated and carbonylated compounds, we supposed that the earthy, mushroom note was due to fenchol, and that chrysanthenone was found to be responsible for a more burnt note. We also suspected (*Z*)-rose oxide to be responsible for the herbaceous odor, and, with a standard injection and after GC-O analysis, we confirm that this compound is responsible for this note. However, fenchol was not perceived as a contributor to rockrose aroma, due to its weak intensity odor strength after GC-O analysis of the standard compound. The coinjection of chrysanthenone is needed to confirm that both odorants could be responsible for odor zone **(5)**.

Similarly, compounds responsible for odor zones **(13)** and **(6)** were eluting almost at the same time. However, most of panelists distinguished the two odors. The odor zone **(13)** with a green leaf, herbal smell was smelled in several fractions of the carbonylated part. The intensity of the perception of the odor zone was decreasing, as the amount of the compound responsible for the odor was itself decreasing. This observation helped us to identify the compound α -campholenic aldehyde to be responsible for odor zone **(13)** (Figure 35).

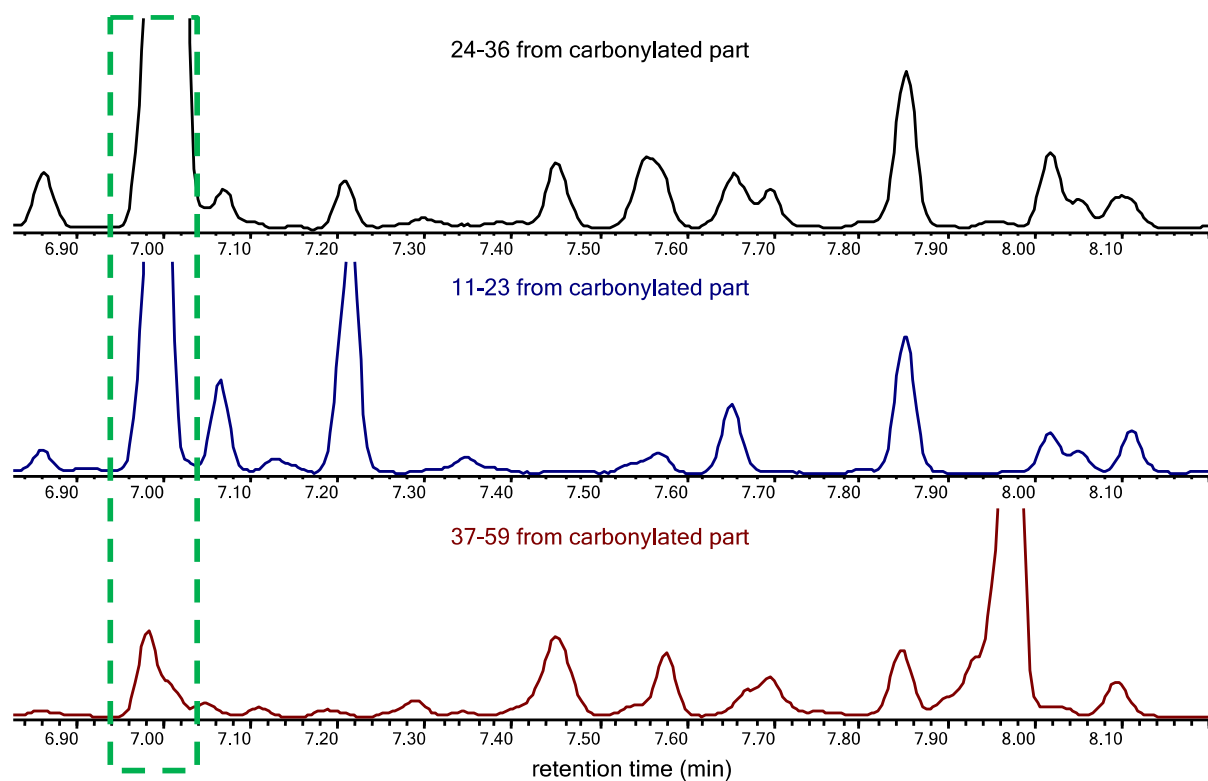


Figure 35 : GC-MS chromatograms of *C. ladanifer* fractions from carbonylated part.

Fragmentation: 70 eV. α -campholenal is attributed to the odor zone **(13)** described in **Table 9** and **Figure 31**. It is framed in green dashed rectangle. In fraction 24-36 the odor zone intensity was judged to be strong, to be moderate in 11-23 fraction, and weaker in 37-59 fraction.

The odor zone **(6)** was smelled by 73% of the panelists. It was supposed to be the result of the odor contributions of tagetone and of nerol oxide. They seem to be responsible for the green, sweet notes perceived. The odor zone **(7)**, with both citrusy and floral notes, was supposed to come from fragrant compounds that coeluted. The floral note was attributed to geraniol, present in fraction DE from the oil, whereas the green, spicy, minty notes were supposed to be due to cuminal and carvone, both present in carbonylated part of *C. ladanifer* oil. However, after standard injection of carvone, and GC-O analyses, this compound was perceived with a low odor intensity, and was thus not contributing to the intense odor zone **(7)** perceived. Eluting at a same time, traces of nerol were also identified. The fruity, lipstick, grape, sweet odor of odor zone **(9)** was thought to be due to myrtenyl and/or pinocarvyl acetate.

For each of these compounds, the injection of standards and combinatorial analyses in GC-O is needed to confirm the odor of these compounds.

The characteristic “clove” odor of the odor zone **(10)**, and “men perfume” of odor zone **(12)**, are due to the presence of eugenol and ambrox, respectively, present in fraction 1-1 from the oil. These odoriferous compounds were confirmed by GC-O analyses of their standard compounds.

In addition to this odor zones, other odoriferous compounds were detected in the oil, and could be responsible of weaker odor zones. This is the case of acetophenone, responsible of the sweet, fruity, floral odor perceived by only few panelists, that was confirmed by GC-O analysis.

Despite the fractionation steps to enrich fractions in certain compounds, the odors **(8)** and **(11)** were not attributed to a compound, probably due to trace amounts of the compounds responsible for the odors. Moreover, a coelution of several could be considered.

Moreover, we cannot exclude that coeluting compounds or compounds not detectable in GC-MS with our method could be responsible for the odors smelled by panelists, because even trace compounds can be perceived as strong odorants [321].

As it is already known in the literature, 2,2,6-trimethyl-cyclohexan-1-one is a key contributor to rockrose fragrance, along with ambrox, that give together the typical *cistus* fragrance. In addition to this compound, we managed to identify campholenal isomers to be responsible of intense, green, camphoreous notes of this oil, and this finding was also supported by Ohloff et al. in their studies on labdanum [209]. Here, we separated the strong odorant ambrox from other fractions, and we managed to identify other strong impact odorants. For instance, the earthy, mushroom-like character of the oil could be due to fenchol among others. The odor zone **(9)** also deserves our attention because it was perceived by panelists at a high frequency (73% NIF) and with a strong intensity, and is consequently a key contributor of fruity-aroma of *Cistus ladanifer*. Further isolation or standard injection of those compounds supposed to be responsible for odor zones need to be subjected to GC-O analyses to evaluate their real contribution to rockrose oil global fragrance.

IV.4. Conclusion

Cistus ladanifer essential oil is a complex oil constituted of more than 200 compounds. Here, we identified 93.7% of its global composition, and we showed that this oil was composed of almost 68% monoterpenoids and 17% of sesquiterpenoids. Since little information is available about the odoriferous components that contribute to *Cistus ladanifer* odor, we performed GC-O analyses on this oil and its fractions, and we observed that some monoterpenoids and other low molecular masses compounds are responsible for the typical *cistus* odor. Using fractionations and injection of reference compounds we managed to identify 14 odor zones contributing to the global odor of this material. We managed to identify 2,2,6-trimethylcyclohexanone, ambrox, eugenol, rose oxide and campholenal to contribute to rockrose global fragrance. Other compounds responsible for the odor zones perceived by panelists remain to be confirmed by further investigations.

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux menés sur ces trois matières odorantes permettent de compléter les connaissances quant à leur composition chimique. Grâce à des analyses olfactométriques et analytiques, nous avons pu identifier et quantifier plusieurs odorants d'impact chez ces espèces, déjà connus pour leurs activités olfactives, et qui contribuent à l'odeur globale des huiles essentielles de ciste ladanifère, de myrrhe et d'encens. Par ailleurs, certains de ces composés, jamais reportés dans les espèces étudiées ici, ont pu être identifiés après plusieurs étapes de fractionnement et d'extraction, et après comparaison avec les données de la littérature, avec l'injection de standards chimiques ou encore après leur caractérisation structurale par RMN. Ces composés à fort impact olfactif vont alors pouvoir être intégrés dans des préparations parfumées ou des arômes pour apporter certaines notes particulières, ou même permettre de recréer et mimer au plus proche de la réalité l'odeur globale de ces huiles essentielles après assemblage de ces composés.

D'autres appareils d'analyse plus performants tels que la GCxGC (chromatographie gazeuse à deux dimensions), permettent une meilleure résolution des pics, grâce à la séparation des composés grâce à deux colonnes différentes. Cette technique offre la possibilité de détecter des composés qui n'avaient pas été résolus par GC simple (co-élutions, par exemple).

De plus, afin de pallier à ce problème de limite quantitative des analyses par RMN, une augmentation de la sensibilité pourrait être envisagée par le choix d'une meilleure sonde telle que la cryosonde par exemple, qui va permettre de réduire le bruit de fond et donc d'augmenter le rapport signal sur bruit.

Par ailleurs, afin d'optimiser la quantification de certains de ces composés odorants présents à l'état de traces, une synthèse avec deux substrats deutérés pourrait être envisagée afin d'introduire un deutérium supplémentaire à une position différente sur le composé, ce qui permettrait l'analyse de plusieurs autres ions fils de forte intensité pour une quantification encore plus fine.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les travaux sur les composés non-volatils de la résine d'encens *Boswellia dalzielii* ont permis une quantification précise de certains composés triterpéniques, grâce à des techniques analytiques performantes de haute précision. En effet, les analyses chromatographiques par UHPLC ont permis une séparation rapide et efficace des composés de la résine d'encens. Ces analyses plus courtes, mais tout aussi résolutive qu'en HPLC, ont permis l'étude de nombreux échantillons. Ainsi, nous avons pu quantifier les acides triterpéniques de la résine d'encens par une méthode robuste et fiable qu'est la méthode des ajouts dosés, dont la chronophagie a pu être limitée. Par ailleurs, le couplage avec l'analyseur Orbitrap a permis de sélectionner les ions précurseurs de nos composés avec une forte exactitude sur leur m/z, permettant ainsi une meilleure identification de ceux-ci avant leur fragmentation par MS/MS, et ainsi, ayant permis une bonne quantification de nos composés avec une haute résolution. Ainsi, nous avons pu montrer que la teneur en certains acides boswelliques spécifiques, connus pour leurs fortes activités biologiques, étaient présents à de fortes concentrations dans la résine de *Boswellia dalzielii*, comparé à d'autres espèces d'encens. Par ailleurs, les différentes étapes d'extraction ont permis une bonne séparation des composés de la résine d'encens, ainsi qu'une bonne identification de ceux-ci. Certaines fractions de la résine ont même été testées *in vitro* afin de déterminer leurs activités biologiques, dans le but de valoriser cette résine peu étudiée.

Afin de compléter ces travaux, des tests cellulaires *in vitro* pourraient être mis en œuvre afin de confirmer la forte activité anti-inflammatoire des extraits de *B. dalzielii*, et ainsi permettre une meilleure valorisation de son huile essentielle et de son résidu de distillation.

Par ailleurs, les travaux sur les composés semi-volatils de l'encens *Boswellia papyrifera* ont permis, grâce à l'utilisation de plusieurs techniques d'extraction, d'extraire préférentiellement et de façon rapide les composés d'intérêt médicinaux de l'espèce. En effet, les diterpènes d'intérêt tels que les cembranoïdes ont pu être extraits de façon exhaustive puis séparés, à des températures assez basses pour éviter leur dégradation. La fraction la plus volatile, contenant les diterpènes d'intérêt, a ainsi pu être analysée, et certains composés nouveaux tels que le composé dérivé de l'acide santonique ont pu être isolés et caractérisés par RMN pour la première fois dans cette espèce. Cependant, de par leur structure moléculaire assez proche, la séparation sur colonne et par GC-préparative ne suffit pas toujours à isoler des composés structurellement similaires, et la limite de ces techniques a été atteinte ici.

Afin de séparer ces composés, d'autres méthodes de séparation puis d'isolation de ces composés telles que l'HPLC-semi-préparative pourraient permettre de surmonter ces limites.

Les travaux menés sur les composés volatils odorants d'encens ont permis, par le biais d'une méthode de quantification rigoureuse, la quantification des acides olibaniques dans une espèce d'encens provenant de différentes origines géographiques. Ces acides olibaniques ont été analysés et quantifiés par GC-MS en mode SIM, ce qui a permis de s'affranchir de co-élutions gênantes pour la quantification. En plus de ce mode de détection très sensible permettant l'analyse d'ions spécifiques, la résolution de la méthode a été optimisée par le choix de la phase stationnaire permettant de séparer ces isomères. Par ailleurs, la méthode SIDA a permis une quantification fine et sensible de ces acides présents à l'état de trace dans les huiles essentielles, jusqu'à des limites de quantification de 3.01 et 1.91 µg/mL, pour les acides trans- et cis-olibaniques, respectivement.

Les travaux menés sur l'huile essentielle de myrrhe, suite à différentes techniques d'extraction physiques et chimiques, ont permis d'extraire sélectivement certains composés. Aussi, les réactions de dégradation par chauffage du mélange silice-huile essentielle, a permis de générer divers composés déjà présents dans

l'huile essentielle, mais en plus grande quantités. Certains de ces composés venant de ces différentes fractions ont pu être isolés par colonne chromatographique ou encore par GC-préparative. Cependant, des phénomènes de dégradation rapides ont été observés par analyse chromatographique mais aussi à l'œil nu, par un changement de couleur de la fraction. Par ailleurs, certains composés moins volatils de l'huile essentielle ont rendu difficile voire impossible l'analyse de certaines fractions de myrrhe en GC-préparative.

Pour finir, du fait du faible rendement de piégeage (*ca.* 60%) des composés d'un échantillon, l'isolation de trop petites quantités de produits rend difficile leur caractérisation par RMN, qui est une technique trop peu sensible. Ainsi, l'analyse spectroscopique en RMN grâce à une cryosonde permettrait d'augmenter la sensibilité de la technique par la diminution du rapport signal sur bruit, et rendrait possible l'analyse de composés obtenus dans de très faibles quantités. Comme pour les travaux sur *B. papyrifera*, l'analyse de certains composés pourrait être possible par l'HPLC-semi-préparative en phase normale, et permettrait d'obtenir de plus grandes quantités de produit.

Les travaux menés sur l'huile essentielle de ciste ont permis l'identification de plus de 150 composés par GC-MS, suite à plusieurs fractionnements chromatographiques sur colonne de silice et silice au nitrate d'argent. Cependant, l'huile essentielle de ciste est très complexe, et près de 300 composés ont été détectés, dont certains à l'état de traces. La majorité de ses constituants étant des monoterpénoïdes très volatils, une méthode d'analyse chromatographique assez lente est nécessaire pour obtenir la meilleure séparation de ces composés. Cependant, l'analyse de cette huile par GC-Olfactométrie est effectuée par une méthode plus courte, permettant de garder l'attention des panelistes, mais engendre alors la co-élution de nombreux composés, rendant leur identification odorante très difficile. Une solution pour éviter cela serait donc que l'analyse soit faite en plusieurs fois par les panelistes, rendant alors l'analyse de cette huile très chronophage.

De même, afin de s'affranchir des co-élutions dues au grand nombre de composés de structures proches, la technique de GCxGC permettrait de résoudre certains problèmes de co-élution, offrant ainsi une meilleure identification des composés.

Pour finir, la technique de GC-préparative n'a pas été utilisée ici, car les monoterpénoïdes étant trop volatils ne sont pas restés piégés. Il faudrait donc mettre en place un système de refroidissement des pièges permettant le piégeage de ces composés.

Pour conclure, ces travaux ont permis de connaître davantage les compositions chimiques des résines d'encens, de myrrhe et de ciste, afin de mieux les valoriser pour leur intérêt scientifique, médicinal et/ou olfactif. Pour compléter ces travaux, l'utilisation de nouvelles techniques et instruments plus sophistiqués tels que l'utilisation de GCxGC, de cryosondes en RMN, d'analyseurs à haute résolution permettraient une étude approfondie des composés d'intérêt de ces différentes matières végétales.

REFERENCES

-
- [1] C. Mora, D.P. Tittensor, S. Adl, A.G.B. Simpson, B. Worm, How Many Species Are There on Earth and in the Ocean?, *PLoS Biol.* 9 (2011) e1001127. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>.
- [2] Christine Avelin, *Marché des plantes à parfum, aromatiques et médicinales - Panorama 2020*, FranceAgriMer. (n.d.).
- [3] V. Quillet, L. Huille, A. Massieu, Service de statistiques nationales d'entreprises, *Les parfums et produits pour la toilette, un atout pour la France*, 2017. <https://www.insee.fr/fr/statistiques/2892821#consulter>.
- [4] J. Baeten, K. Deforce, S. Challe, D. De Vos, P. Degryse, Holy Smoke in Medieval Funerary Rites: Chemical Fingerprints of Frankincense in Southern Belgian Incense Burners, *PLoS ONE.* 9 (2014) e113142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113142>.
- [5] R. Gyselen, *Parfums d'Orient*, Peeters Publishers, 1998. <https://halshs.archives-ouvertes.fr/halshs-01612843>.
- [6] M.R. Belgiorno, Experimental archaeology 1. Tepe Gawra and the spread of its channel jar to Slovakia, Sardinia and Cyprus, in: *Distill.*, Antonio De Strobel, Nicosia, 2018.
- [7] M.-C. Grasse, *Une histoire mondiale du parfum: des origines à nos jours*, Musée international de la parfumerie Somogy, éd. d'art, Grasse Paris, 2007.
- [8] É. de Feydeau, *Dictionnaire amoureux du parfum*, Place des éditeurs, 2021. <https://books.google.fr/books?id=36weEAAAQBAJ>.
- [9] É. de Feydeau, *Les parfums: histoire, anthologie, dictionnaire*, R. Laffont, Paris, 2011.
- [10] A. Le Guérer, *Le parfum des origines à nos jours*, O. Jacob, Paris, 2005.
- [11] N.St.J. Groom, The Perfume Handbook, in: *Perfume Handb.*, 1st edition, Chapman & Hall, 1992: pp. 36–64.
- [12] P.H. Larcher, *Histoire d'Hérodote*, Charpentier, 1850. <https://books.google.fr/books?id=gp9QAAAAcAAJ>.
- [13] J. Defradas, Le Banquet de Xénophane, *Rev. Études Grecques.* 75 (1962) 344–365. <https://doi.org/10.3406/reg.1962.3709>.
- [14] J.-P. Brun, The Production of Perfumes in Antiquity: The Cases of Delos and Paestum, *Am. J. Archaeol.* 104 (2000) 277–308. <https://doi.org/10.2307/507452>.
- [15] A. Moreau, Le fabuleux, le divin, le parfum : Aphrodite maîtresse des odeurs, in: P. Carmignani, J.-Y. Laurichesse, J. Thomas (Eds.), *Saveurs Senteurs Goût Méditerranée*, Presses universitaires de Perpignan, 1998: pp. 41–58. <https://doi.org/10.4000/books.pupvd.30649>.
- [16] C. Castel, X. Fernandez, J.-J. Filippi, J.-P. Brun, Perfumes in Mediterranean antiquity, *Flavour Fragr. J.* 24 (2009) 326–334. <https://doi.org/10.1002/ffj.1944>.
- [17] L. Bodiou, D. Frère, V. Mehl, *Parfums et odeurs dans l'Antiquité*, Presses universitaires de Rennes, Rennes, 2008.
- [18] J. McHugh, *Sandalwood and Carrion: Smell in Indian Religion and Culture*, OUP USA, 2012. <https://books.google.fr/books?id=AXexWu3OsvsC>.

- [19] L.G. Annick, *Le parfum porteur de rêve et miroir de la société*, (2012). <https://annickleguerer.com/wp-content/uploads/2019/11/le-parfum.pdf>.
- [20] L. Peyron, *Odeurs, parfums et parfumeurs lors des grandes épidémies méridionales de peste, Arles 1720.*, in: *Conférence présentée devant l'Académie d'Arles*, 1986: p. 67.
- [21] N. de Barry, A. Lopez de Carrion, *101 parfums à découvrir*, Dunod, Paris, 2014.
- [22] J.-C. Guéguen, *L'odyssée des parfums: de la thérapeutique à l'esthétique*, Pharmathèmes, Paris, 2006.
- [23] F. Pavia, M. Prier, *L'univers des parfums*, Solar, Paris, 2003.
- [24] M. Adenot, *Initiation à la chimie médicinale: les voies de la découverte des médicaments*, Ellipses, Paris, 2000.
- [25] C.A. Michie, E. Cooper, Frankincense and myrrh as remedies in children, *J. R. Soc. Med.* 84 (1991) 602–605.
- [26] V. Fintelmann, R.F. Weiss, *Manuel pratique de phytothérapie*, Vigot, Paris, 2004.
- [27] L. Moulinier, Pierre Monat, trad. — Hildegarde de Bingen, *Les causes et les remèdes*. Grenoble, Millon, 1997 (Atopia), *Cah. Civilis. Médiév.* 41 (1998) 411–414. https://www.persee.fr/doc/ccmed_0007-9731_1998_num_41_164_2735_t1_0411_0000_3.
- [28] J.C. Kramer, Opium Rampant: Medical Use, Misuse and Abuse in Britain and the West in the 17th and 18th Centuries, *Addiction.* 74 (1979) 377–389. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.1979.tb01367.x>.
- [29] P. Grandjean, Paracelsus Revisited: The Dose Concept in a Complex World, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119 (2016) 126–132. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12622>.
- [30] B. Gorceix, Paracelse (1493-1541), *Encycl. Universalis.* (n.d.). <http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/paracelse/> (accessed September 14, 2022).
- [31] R. Woolmer, The role of chance in the development of anaesthesia, *Br. J. Anaesth.* 24 (1952) 137–144. <https://doi.org/10.1093/bja/24.2.137>.
- [32] J.B. Jin, B. Cai, J.-M. Zhou, Salicylic acid, in: *Horm. Metab. Signal. Plants*, Elsevier, 2017: pp. 273–289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00008-6>.
- [33] M.E. Wall, M.C. Wani, Camptothecin and taxol: from discovery to clinic, *J. Ethnopharmacol.* 51 (1996) 239–254. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01367-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01367-9).
- [34] T. Youyou, Artemisinin—A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World, (n.d.) 31.
- [35] World Health Organization, *WHO traditional medicine strategy: 2014-2023*, World Health Organization, Geneva, 2013. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/92455> (accessed September 9, 2022).
- [36] J. Raynaud, J.-M. Blanchet, *Prescription et conseil en phytothérapie*, Éd. Tec & doc Éd. médicales internationales, Paris Londres New York Cachan, 2005.
- [37] J. Fleurentin, J.-C. Hayon, *Les plantes qui nous soignent: traditions et thérapeutique*, Éd. “Ouest-France,” Rennes, 2007.

- [38] F.L. Hakkim, S.S. Hassan, J. Al-Sabahi, M. Al-Buloshi, Chemical Profiling and Anti-Microbial Activity of Frankincense (*Boswellia sacra*) Derived Heavy oil, (n.d.) 5.
- [39] S.F. Van Vuuren, G.P.P. Kamatou, A.M. Viljoen, Volatile composition and antimicrobial activity of twenty commercial frankincense essential oil samples, *South Afr. J. Bot.* 76 (2010) 686–691. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.06.001>.
- [40] E. Lubinic, *Manuel pratique d'aromathérapie: les huiles essentielles et leur utilisation*, Vigot, Paris, 2003.
- [41] X. Fernandez, F. Chémat, T.K.T. Do, *Les huiles essentielles: vertus et applications*, Vuibert, Paris, 2012.
- [42] H. Baydar, H. Schulz, H. Krüger, S. Erbas, S. Kineci, Influences of Fermentation Time, Hydro-distillation Time and Fractions on Essential Oil Composition of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.), *J. Essent. Oil Bear. Plants.* 11 (2008) 224–232. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643624>.
- [43] N. Vallet, S. Raynal, *Formulation en parfumerie: art & science*, COSMETIC VALLEY, CHARTRES, 2021.
- [44] Albert Vieille -Givaudan, *Lexique - résinoïde*, (n.d.). <https://www.albertvieille.com/lexique/resinoide/>.
- [45] H. Plainfosse, *Recherche et développement d'ingrédients cosmétiques innovants favorisant la réparation cutanée à partir de matières premières naturelles d'origine méditerranéenne*, Theses, COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02879832>.
- [46] M. Robert, *Les solvants eutectiques comme milieu d'extraction de composés polaires bioactifs à partir de sons céréalières*, (2017) 68 p. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01603214>.
- [47] J.J.W. Coppen, *Gums, resins and latexes of plant origin*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1995.
- [48] P. Baran, K. Aktaş, C. Özdemir, Structural investigation of the glandular trichomes of endemic *Salvia smyrnea* L., *South Afr. J. Bot.* 76 (2010) 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.04.011>.
- [49] J.R. Barnett, Langenheim, J.H. *Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany.*, *Ann. Bot.* 93 (2004) 784–785. <https://doi.org/10.1093/aob/mch103>.
- [50] G. Gigliarelli, J. Becerra, M. Curini, M. Marcotullio, Chemical Composition and Biological Activities of Fragrant Mexican Copal (*Bursera* spp.), *Molecules.* 20 (2015) 22383–22394. <https://doi.org/10.3390/molecules201219849>.
- [51] F.N. Howes, *Vegetable Gums and Resins*, Scientific Publishers, 2001. <https://books.google.fr/books?id=JfdxAAAACAAJ>.
- [52] A. Nussinovitch, *Plant Gum Exudates of the World: Sources, Distribution, Properties, and Applications*, CRC Press, 2009. <https://books.google.fr/books?id=HnAnETsS1zsC>.
- [53] A. Al-Harrasi, N.U. Rehman, A.L. Khan, M. Al-Broumi, I. Al-Amri, J. Hussain, H. Hussain, R. Csuk, Chemical, molecular and structural studies of *Boswellia* species: β -Boswellic Aldehyde and 3-epi-11 β -Dihydroxy BA as precursors in biosynthesis of boswellic acids, *PloS One.* 13 (2018) e0198666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198666>.

- [54] H.N. Murthy, *Gums, Resins and Latexes of Plant Origin: Chemistry, Biological Activities and Uses*, Springer International Publishing, 2022. <https://books.google.fr/books?id=cuF8EAAAQBAJ>.
- [55] S. Meyer, C. Reeb, R. Bosdeveix, *Botanique: biologie et physiologie végétales*, 3e éd, Maloine, Paris, 2019.
- [56] K. F. Raffa, B.H. Aukema, N. Erbilgin, K.D. Klepzig, K.F. Wallin, Recent advances in phytochemistry. Chapter four : Interactions among conifer terpenoids and bark beetles across multiple levels of scale: An attempt to understand links between population patterns and physiological processes, 2005.
- [57] J. Fang, S. Zhang, F. Liu, B. Cheng, Z. Zhang, Q. Zhang, X. Kong, Functional investigation of monoterpenes for improved understanding of the relationship between hosts and bark beetles, *J. Appl. Entomol.* 145 (2021) 303–311. <https://doi.org/10.1111/jen.12850>.
- [58] M. Lemenith, D. Teketay, Frankincense and myrrh resources of Ethiopia: II. Medicinal and industrial uses, *SINET Ethiop. J. Sci.* 26 (2005) 161–172. <https://doi.org/10.4314/sinet.v26i2.18213>.
- [59] A. Dekebo, E. Dagne, O.R. Gautun, A.J. Aasen, Triterpenes from the resin of *Boswellia neglecta*, *Bull Chem Soc Ethiop.* (2002) 4.
- [60] H. Sommerlatte, B.-E.V. Wyk, Observations on the Association between Some Buprestid and Cerambycid Beetles and Black Frankincense Resin Inducement, *Diversity.* 14 (2022) 58. <https://doi.org/10.3390/d14010058>.
- [61] P. Shivanand, N.F. Arbie, S. Krishnamoorthy, N. Ahmad, Agarwood—The Fragrant Molecules of a Wounded Tree, *Molecules.* 27 (2022) 3386. <https://doi.org/10.3390/molecules27113386>.
- [62] P.S. Naziz, R. Das, S. Sen, The Scent of Stress: Evidence From the Unique Fragrance of Agarwood, *Front. Plant Sci.* 10 (2019) 840. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00840>.
- [63] L. Tissandié, *Analyse et valorisation des matières premières à odeur boisée : ciblage des composés odorants*, PhD Thesis, 2018. <http://www.theses.fr/2018AZUR4244/document>.
- [64] C.D. Stalikas, Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3268–3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>.
- [65] L.M. Weaver, K.M. Herrmann, Dynamics of the shikimate pathway in plants, *Trends Plant Sci.* 2 (1997) 346–351. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)84622-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)84622-5).
- [66] V. Lattanzio, Phenolic Compounds: Introduction 50, *Nat Prod.* (2013) 1543–1580.
- [67] E. Valanciene, I. Jonuskiene, M. Syrpas, E. Augustiniene, P. Matulis, A. Simonavicius, N. Malys, Advances and Prospects of Phenolic Acids Production, Biorefinery and Analysis, *Biomolecules.* 10 (2020) 874. <https://doi.org/10.3390/biom10060874>.
- [68] A.L. Khan, A. Al-Harrasi, J.-P. Wang, S. Asaf, J.-J.M. Riethoven, T. Shehzad, C.-S. Liew, X.-M. Song, D.P. Schachtman, C. Liu, J.-G. Yu, Z.-K. Zhang, F.-B. Meng, J.-Q. Yuan, C. Wei, H. Guo, X. Wang, A. Al-Rawahi, I.-J. Lee, J.L. Bennetzen, X.-Y. Wang, Genome structure and evolutionary history of frankincense producing *Boswellia sacra*, *IScience.* 25 (2022) 104574. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104574>.
- [69] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, The molecular basis of working mechanism of natural

- polyphenolic antioxidants, *Food Chem.* 125 (2011) 288–306.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.012>.
- [70] A. Tapas, D. Sakarkar, R. Kakde, Flavonoids as Nutraceuticals: A Review, *Trop. J. Pharm. Res.* 7 (2008) 1089–1099. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v7i3.14693>.
- [71] S.-M. Choi, B.C. Kim, Y.-H. Cho, K.-H. Choi, J. Chang, M.-S. Park, M.-K. Kim, K.-H. Cho, J.-K. Kim, Effects of Flavonoid Compounds on β -amyloid-peptide-induced Neuronal Death in Cultured Mouse Cortical Neurons, *Chonnam Med. J.* 50 (2014) 45. <https://doi.org/10.4068/cmj.2014.50.2.45>.
- [72] S.J. Maleki, J.F. Crespo, B. Cabanillas, Anti-inflammatory effects of flavonoids, *Food Chem.* 299 (2019) 125124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>.
- [73] M. Abotaleb, S. Samuel, E. Varghese, S. Varghese, P. Kubatka, A. Liskova, D. Büsselberg, Flavonoids in Cancer and Apoptosis, *Cancers.* 11 (2018) 28. <https://doi.org/10.3390/cancers11010028>.
- [74] A. Roy, A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants, *IJPB.* 3 (2017) 1–9.
- [75] K. Shankar, H.M. Mehendale, Oxidative Stress, in: *Encycl. Toxicol.*, Elsevier, 2014: pp. 735–737. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00345-6>.
- [76] D. Tagliazucchi, Melanoidins from Coffee and Lipid Peroxidation, in: *Coffee Health Dis. Prev.*, Elsevier, 2015: pp. 859–867. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00095-4>.
- [77] E.A. Decker, B. Chen, A. Panya, R.J. Elias, Understanding antioxidant mechanisms in preventing oxidation in foods, in: *Oxid. Foods Beverages Antioxid. Appl.*, Elsevier, 2010: pp. 225–248. <https://doi.org/10.1533/9780857090447.2.225>.
- [78] C. Rice-Evans, N. Miller, G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci.* 2 (1997) 152–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2).
- [79] A. Blom van Staden, N. Lall, Medicinal Plants as Alternative Treatments for Progressive Macular Hypomelanosis, in: *Med. Plants Holist. Health Well-Being*, Elsevier, 2018: pp. 145–182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812475-8.00005-6>.
- [80] R.M. Slominski, M.A. Zmijewski, A.T. Slominski, The role of melanin pigment in melanoma, *Exp. Dermatol.* 24 (2015) 258–259. <https://doi.org/10.1111/exd.12618>.
- [81] Z. Yang, Y. Wang, Y. Wang, Y. Zhang, Bioassay-guided screening and isolation of α -glucosidase and tyrosinase inhibitors from leaves of *Morus alba*, *Food Chem.* 131 (2012) 617–625. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.040>.
- [82] C.-H. Eun, M.-S. Kang, I.-J. Kim, Elastase/Collagenase Inhibition Compositions of Citrus unshiu and Its Association with Phenolic Content and Anti-Oxidant Activity, *Appl. Sci.* 10 (2020) 4838. <https://doi.org/10.3390/app10144838>.
- [83] T.S. Thring, P. Hili, D.P. Naughton, Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants, *BMC Complement. Altern. Med.* 9 (2009) 27. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-27>.
- [84] J.P. Piwowarski, A.K. Kiss, M. Kozłowska-Wojciechowska, Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional Polish medicine for external treatment

- of diseases with inflammatory background, *J. Ethnopharmacol.* 137 (2011) 937–941.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.039>.
- [85] L. Panzella, A. Napolitano, Natural and Bioinspired Phenolic Compounds as Tyrosinase Inhibitors for the Treatment of Skin Hyperpigmentation: Recent Advances, *Cosmetics*. 6 (2019) 57.
<https://doi.org/10.3390/cosmetics6040057>.
- [86] Y.M. Kim, J. Yun, C.-K. Lee, H. Lee, K.R. Min, Y. Kim, Oxyresveratrol and Hydroxystilbene Compounds, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16340–16344. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200678200>.
- [87] C.-I. Chang, W.-C. Chien, K.-X. Huang, J.-L. Hsu, Anti-Inflammatory Effects of Vitisinol A and Four Other Oligostilbenes from *Ampelopsis brevipedunculata* var. *Hancei*, *Molecules*. 22 (2017) 1195.
<https://doi.org/10.3390/molecules22071195>.
- [88] I. Schneider, F. Bucar, Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase[sol]cyclooxygenase, *Phytother. Res.* 19 (2005) 81–102. <https://doi.org/10.1002/ptr.1603>.
- [89] J. van Meerloo, G.J.L. Kaspers, J. Cloos, Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay, in: I.A. Cree (Ed.), *Cancer Cell Cult.*, Humana Press, Totowa, NJ, 2011: pp. 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20.
- [90] M. Nassra, S. Krisa, Y. Papastamoulis, G. Kapche, J. Bisson, C. André, J.-P. Konsman, J.-M. Schmitter, J.-M. Mérillon, P. Waffo-Téguo, Inhibitory Activity of Plant Stilbenoids against Nitric Oxide Production by Lipopolysaccharide-Activated Microglia, *Planta Med.* 79 (2013) 966–970.
<https://doi.org/10.1055/s-0032-1328651>.
- [91] A. Aranda, L. Sequedo, L. Tolosa, G. Quintas, E. Burello, J.V. Castell, L. Gombau, Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells, *Toxicol. In Vitro.* 27 (2013) 954–963.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.016>.
- [92] D. Díaz, C. Gómez, R. Muñoz-Castañeda, F. Baltanás, J.R. Alonso, E. Weruaga, The Olfactory System as a Puzzle: Playing With Its Pieces: Playing with the Tabs, *Anat. Rec.* 296 (2013) 1383–1400.
<https://doi.org/10.1002/ar.22748>.
- [93] J.-C. Ellena, *Le parfum*, 6e éd. mise à jour, Que sais-je ?, Paris, 2021.
- [94] A. Matsui, Y. Go, Y. Niimura, Degeneration of olfactory receptor gene repertoires in primates: no direct link to full trichromatic vision, *Mol. Biol. Evol.* 27 (2010) 1192–1200.
- [95] S.I. Korsching, Olfactory Receptors, in: *Encycl. Biol. Chem.*, Elsevier, 2013: pp. 345–349.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00676-9>.
- [96] B.N. Landis, C.G. Konnerth, T. Hummel, A study on the frequency of olfactory dysfunction, *The Laryngoscope*. 114 (2004) 1764–1769.
- [97] S.S. Schiffman, Smell and Taste, in: *Encycl. Gerontol.*, Elsevier, 2007: pp. 515–525.
<https://doi.org/10.1016/B0-12-370870-2/00173-6>.
- [98] B. Hu, J. Zhang, M. Gong, Y. Deng, Y. Cao, Y. Xiang, D. Ye, Research Progress of Olfactory Nerve Regeneration Mechanism and Olfactory Training, *Ther. Clin. Risk Manag.* Volume 18 (2022) 185–195.
<https://doi.org/10.2147/TCRM.S354695>.

- [99] M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska, *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, CRC Press, 2008. https://books.google.fr/books?id=fBCDK_Tgh10C.
- [100] A. Rouessac, F. Rouessac, *L'essentiel de techniques instrumentales d'analyse chimique*, Dunod, Malakoff, 2021.
- [101] M.E. Swartz, B.J. Murphy, *Ultra Performance Liquid Chromatography: Tomorrow's HPLC Technology Today*, (2005).
- [102] R.L. Grob, E.F. Barry, *Modern Practice of Gas Chromatography*, Wiley, 2004. https://books.google.fr/books?id=2L_H2l5STa8C.
- [103] H. van Den Dool, P. Dec. Kratz, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography, *J. Chromatogr. A.* 11 (1963) 463–471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X).
- [104] N. Baldovini, A. Chaintreau, Identification of key odorants in complex mixtures occurring in nature, *Nat. Prod. Rep.* 37 (2020) 1589–1626. <https://doi.org/10.1039/D0NP00020E>.
- [105] C.M. Delahunty, G. Eyres, J.-P. Dufour, Gas chromatography-olfactometry, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2107–2125. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500509>.
- [106] P. Pollien, A. Ott, F. Montigon, M. Baumgartner, R. Muñoz-Box, A. Chaintreau, Hyphenated Headspace-Gas Chromatography-Sniffing Technique: Screening of Impact Odorants and Quantitative Aromagram Comparisons, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2630–2637. <https://doi.org/10.1021/jf960885r>.
- [107] S. Vanruth, J. Roozen, Gas chromatography/sniffing port analysis and sensory evaluation of commercially dried bell peppers (*Capsicum annuum*) after rehydration, *Food Chem.* 51 (1994) 165–170. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90251-8](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90251-8).
- [108] E. De Hoffmann, V. Stroobant, *Spectrométrie de masse: cours et exercices corrigés*, 3e éd, Dunod, Paris, 2005.
- [109] F. Rouessac, A. Rouessac, D. Cruché, C. Duverger-Arfulso, A. Martel, *Analyse chimique: méthodes et techniques instrumentales*, 8e éd, Dunod, Paris, 2016.
- [110] G.L. Glish, R.W. Vachet, The basics of mass spectrometry in the twenty-first century, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 140–150. <https://doi.org/10.1038/nrd1011>.
- [111] R.A. Zubarev, A. Makarov, Orbitrap Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 5288–5296. <https://doi.org/10.1021/ac4001223>.
- [112] R. Verpoorte, Y.H. Choi, N.R. Mustafa, H.K. Kim, Metabolomics: back to basics, *Phytochem. Rev.* 7 (2008) 525–537. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9091-7>.
- [113] A. Weeks, F. Zapata, S.K. Pell, D.C. Daly, J.D. Mitchell, P.V.A. Fine, To move or to evolve: contrasting patterns of intercontinental connectivity and climatic niche evolution in “Terebinthaceae” (Anacardiaceae and Burseraceae), *Front. Genet.* 5 (2014). <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00409>.
- [114] S. Basar, *Phytochemical Investigations on Boswellia Species: Comparative Studies on the Essential Oils, Pyrolysates and Boswellic Acids of Boswellia Carterii Birdw., Boswellia Serrata Roxb., Boswellia Frereana Birdw., Boswellia Neglecta S. Moore and Boswellia Rivae Engl*, 2005.
- [115] L. Peyron, J. Acchiardi, D. Bignotti, P. Pellerin, *Comparaison des extraits odorants d'encens*

- obtenus par des technologies diverses à partir de gommes d'origines géographiques différentes, Proc. 8th Int Congr Essent Oils. (1980).
- [116] R.A.A. Mothana, S.S. Hasson, W. Schultze, A. Mowitz, U. Lindequist, Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of three endemic Soqotraen *Boswellia* species, Food Chem. 126 (2011) 1149–1154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.150>.
- [117] A. Dekebo, M. Zewdu, E. Dagne, Volatile oils of frankincense from *Boswellia papyrifera*, Bull. Chem. Soc. Ethiop. 13 (1999) 93–96. <https://doi.org/10.4314/bcse.v13i1.21061>.
- [118] I. Abdurrahman, H. Yu-Lai, Y. Cai-Xia, T.E. Hagr, Identification and characterization of diterpenes from ethyl acetate fraction of stem barks of *Boswellia papyrifera* (del) hochst, sudanese medicinal plant, Asian J. Green Chem. (2018). <https://doi.org/10.22034/ajgc.2018.142810.1089>.
- [119] A. Decarlo, Frankincense Varieties and Habitats, Part 2, Perfum. Flavorist. 44 (2019) 8.
- [120] M. Lemenih, D. Teketay, Review Article: Frankincense and myrrh resources of Ethiopia: I distribution, production, opportunities for dryland development and research needs, SINET Ethiop. J. Sci. 26 (2004) 63–72. <https://doi.org/10.4314/sinet.v26i1.18201>.
- [121] M. Thulin, A. Decarlo, S.P. Johnson, *Boswellia occulta* (Burseraceae) , a new species of frankincense tree from Somalia (Somaliland), Phytotaxa. 394 (2019) 219. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.394.3.3>.
- [122] A. DeCarlo, S. Johnson, A. Poudel, P. Satyal, L. Bangerter, W.N. Setzer, Chemical Variation in Essential Oils from the Oleo-gum Resin of *Boswellia carteri* : A Preliminary Investigation, Chem. Biodivers. 15 (2018) e1800047. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800047>.
- [123] J.K.N. Jones, J.R. Nunn, The Structure of Frankincense Gum, J. Am. Chem. Soc. 77 (1955) 5745–5746. <https://doi.org/10.1021/ja01626a089>.
- [124] P. Satyal, R.S. Pappas, First Reporting on the Chemistry and Biological Activity of a Novel *Boswellia* chemotype: The Methoxy Alkane Frankincense, (2016) 10.
- [125] J. Niebler, J. Eslamieh, A. Buettner, Frankincense Revisited, Part II: Volatiles in Rare *Boswellia* Species and Hybrids, Chem. Biodivers. 13 (2016) 630–643. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500339>.
- [126] G. Vernin, C. Boniface, J. Metzger, Y. Maire, A. Rakotorijaona, D. Fraisse, C. Parkanyi, GC-MS data bank analysis of the essential oils from *Boswellia Frereana* Birdw and *Boswellia Carterii* Birdw., Developments in food science. (1990).
- [127] A. Al-Harrasi, S.K. Avula, R. Csuk, B. Das, Cembranoids from *Boswellia* species, Phytochemistry. 191 (2021) 112897. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112897>.
- [128] M.M.R. de Melo, R.M.A. Domingues, A.J.D. Silvestre, C.M. Silva, Extraction and Purification of Triterpenoids using Supercritical Fluids: From Lab to Exploitation, in: 2014. <https://doi.org/10.2174/1570193x113106660002>.
- [129] A.C. Siani, M.J. Nakamura, D.S. dos Santos, J.L. Mazzei, A.C. do Nascimento, L.M.M. Valente, Efficiency and selectivity of triterpene acid extraction from decoctions and tinctures prepared from apple peels, Pharmacogn. Mag. 10 (2014) S225–S231. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.133236>.

- [130] N. Sharma, V. Bhardwaj, S. Singh, S.A. Ali, D.K. Gupta, S. Paul, N.K. Satti, S. Chandra, M.K. Verma, Simultaneous quantification of triterpenoic acids by high performance liquid chromatography method in the extracts of gum resin of *Boswellia serrata* obtained by different extraction techniques, *Chem. Cent. J.* 10 (2016) 49. <https://doi.org/10.1186/s13065-016-0194-8>.
- [131] B. Büchele, W. Zugmaier, T. Simmet, Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related phytopharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene, *J. Chromatogr. B.* 791 (2003) 21–30. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00160-0](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00160-0).
- [132] G. Mannino, A. Occhipinti, M. Maffei, Quantitative Determination of 3-O-Acetyl-11-Keto- β Boswellic Acid (AKBA) and Other Boswellic Acids in *Boswellia sacra* Flueck (syn. *B. carteri* Birdw) and *Boswellia serrata* Roxb, *Molecules.* 21 (2016) 1329. <https://doi.org/10.3390/molecules21101329>.
- [133] V. Goulas, G.A. Manganaris, Towards an efficient protocol for the determination of triterpenic acids in olive fruit: a comparative study of drying and extraction methods, *Phytochem. Anal. PCA.* 23 (2012) 444–449. <https://doi.org/10.1002/pca.1378>.
- [134] M. Schmiech, S.J. Lang, K. Werner, L.J. Rahan, T. Syrovets, T. Simmet, Comparative Analysis of Pentacyclic Triterpenic Acid Compositions in Oleogum Resins of Different *Boswellia* Species and Their In Vitro Cytotoxicity against Treatment-Resistant Human Breast Cancer Cells, *Molecules.* 24 (2019) 2153. <https://doi.org/10.3390/molecules24112153>.
- [135] A. Gupta, P. Maheta, R. Chauhan, S. Pandey, J.S. Yadav, S. Shah, Simultaneous Quantification of Bioactive Triterpene acids (Ursolic acid and Oleanolic acid) in Different Extracts of *Eucalyptus globulus* (L) by HPTLC Method, *Pharmacogn. J.* 10 (2017) 179–185. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.1.30>.
- [136] A.C. Estrada, T. Syrovets, K. Pitterle, O. Lunov, B. Büchele, J. Schimana-Pfeifer, T. Schmidt, S.A.F. Morad, T. Simmet, Tirucallic Acids Are Novel Pleckstrin Homology Domain-Dependent Akt Inhibitors Inducing Apoptosis in Prostate Cancer Cells, *Mol. Pharmacol.* 77 (2010) 378–387. <https://doi.org/10.1124/mol.109.060475>.
- [137] M. Yoshikawa, T. Morikawa, H. Oominami, H. Matsuda, Absolute Stereostructures of Olibanumols A, B, C, H, I, and J from Olibanum, Gum-Resin of *Boswellia carterii*, and Inhibitors of Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide-Activated Mouse Peritoneal Macrophages, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 57 (2009) 957–964. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.957>.
- [138] C. Mathe, J. Connan, P. Archier, M. Mouton, C. Vieillescazes, Analysis of Frankincense in Archaeological Samples by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Ann. Chim.* 97 (2007) 433–445. <https://doi.org/10.1002/adic.200790029>.
- [139] A.O. Tucker, Frankincense and Myrrh, *Econ. Bot.* 40 (1986) 425–433. <http://www.jstor.org/stable/4254901>.
- [140] H. Safayhi, T. Mack, J. Sabieraj, M.I. Anazodo, L.R. Subramanian, H.P. Ammon, Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261 (1992) 1143–1146. <http://jpet.aspetjournals.org/content/261/3/1143> (accessed October 22, 2019).
- [141] T. Shen, H.-X. Lou, Bioactive Constituents of Myrrh and Frankincense, Two Simultaneously Prescribed Gum Resins in Chinese Traditional Medicine, 5 (2008) 14.

- [142] T. Morikawa, H. Oominami, H. Matsuda, M. Yoshikawa, New terpenoids, olibanumols D–G, from traditional Egyptian medicine olibanum, the gum-resin of *Boswellia carterii*, *J. Nat. Med.* 65 (2011) 129–134. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0472-z>.
- [143] S.H. Nile, A. Nile, J. Liu, D.H. Kim, G. Kai, Exploitation of apple pomace towards extraction of triterpenic acids, antioxidant potential, cytotoxic effects, and inhibition of clinically important enzymes, *Food Chem. Toxicol.* 131 (2019) 110563. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110563>.
- [144] P.F.P. Santos, L.N.L.F. Gomes, J.L. Mazzei, A.P.A. Fontão, A.L.F. Sampaio, A.C. Siani, L.M.M. Valente, Polyphenol and triterpenoid constituents of *Eugenia florida* dc. (*myrtaceae*) leaves and their antioxidant and cytotoxic potential, *Quím. Nova.* 41 (2018) 1140–1149. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170284>.
- [145] H.-Q. Yuan, F. Kong, X.-L. Wang, C.Y.F. Young, X.-Y. Hu, H.-X. Lou, Inhibitory effect of acetyl-11-keto- β -boswellic acid on androgen receptor by interference of Sp1 binding activity in prostate cancer cells, *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008) 2112–2121. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.03.005>.
- [146] M.M. Suhail, W. Wu, A. Cao, F.G. Mondalek, K.-M. Fung, P.-T. Shih, Y.-T. Fang, C. Woolley, G. Young, H.-K. Lin, *Boswellia sacra* essential oil induces tumor cell-specific apoptosis and suppresses tumor aggressiveness in cultured human breast cancer cells, *BMC Complement. Altern. Med.* 11 (2011) 129. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-129>.
- [147] F. Pollastro, S. Golin, G. Chianese, M.Y. Putra, A.S. Moriello, L.D. Petrocellis, V. Garc, O. Tagliatela-Scafati, G. Appendino, Neuroactive and Anti-inflammatory Frankincense Cembranes: A Structure–Activity Study, *J Nat Prod.* (2016) 7.
- [148] T. Schmidt, M. Kaiser, R. Brun, Complete Structural Assignment of Serratol, a Cembrane-Type Diterpene from *Boswellia serrata*, and Evaluation of Its Antiprotozoal Activity, *Planta Med.* 77 (2011) 849–850. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250612>.
- [149] A. Al-Harrasi, R. Csuk, A. Khan, J. Hussain, Distribution of the anti-inflammatory and anti-depressant compounds: Incensole and incensole acetate in genus *Boswellia*, *Phytochemistry.* 161 (2019) 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.01.007>.
- [150] H. Obermann, Les différences chimiques et olfactives des gommés-résines boswelliques, *Dragoco Rep.* (1978) 260–264.
- [151] J. Niebler, A. Buettner, Pyrolysis-GC–MS–Olfactometry: A new approach to identify thermally generated odorants in frankincense, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 113 (2015) 690–700. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2015.04.018>.
- [152] J. Niebler, K. Zhuravlova, M. Minceva, A. Buettner, Fragrant Sesquiterpene Ketones as Trace Constituents in Frankincense Volatile Oil of *Boswellia sacra*, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 1160–1164. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00836>.
- [153] C. Cerutti-Delasalle, M. Mehiri, C. Cagliero, P. Rubiolo, C. Bicchi, U.J. Meierhenrich, N. Baldovini, The (+)-*cis*- and (+)-*trans*-Olibanic Acids: Key Odorants of Frankincense, *Angew. Chem. Int. Ed.* 55 (2016) 13719–13723. <https://doi.org/10.1002/anie.201605242>.
- [154] A. DeCarlo, S. Johnson, K.I. Okeke-Agulu, N.S. Dosoky, S.J. Wax, M.S. Owolabi, W.N. Setzer, Compositional analysis of the essential oil of *Boswellia dalzielii* frankincense from West Africa reveals two major chemotypes, *Phytochemistry.* 164 (2019) 24–32.

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.04.015>.

- [155] E.Y.H. Nomicos, Myrrh: Medical Marvel or Myth of the Magi?, *Holist. Nurs. Pract.* 21 (2007) 308–323. <https://doi.org/10.1097/01.HNP.0000298616.32846.34>.
- [156] A. Weeks, D.C. Daly, B.B. Simpson, The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data, *Mol. Phylogenet. Evol.* 35 (2005) 85–101. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.12.021>.
- [157] A. Weeks, B.B. Simpson, Molecular phylogenetic analysis of *Commiphora* (Burseraceae) yields insight on the evolution and historical biogeography of an “impossible” genus, *Mol. Phylogenet. Evol.* 42 (2007) 62–79. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.06.015>.
- [158] M.R. Gostel, P.B. Phillipson, A. Weeks, Phylogenetic Reconstruction of the Myrrh Genus, *Commiphora* (Burseraceae), Reveals Multiple Radiations in Madagascar and Clarifies Infrageneric Relationships, *Syst. Bot.* 41 (2016) 67–81. <https://doi.org/10.1600/036364416X690598>.
- [159] S. Demissew, A Description of Some Essential Oil Bearing Plants in Ethiopia and Their Indigenous Uses, *J. Essent. Oil Res.* 5 (1993) 465–479. <https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698266>.
- [160] A. Al-Harrasi, A.L. Khan, S. Asaf, A. Al-Rawahi, Biology of genus *Boswellia*, 2019. <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=5771071> (accessed May 12, 2020).
- [161] K. Morteza-Semnani, M. Saeedi, Constituents of the Essential Oil of *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. var. *molmol*, *J. Essent. Oil Res.* 15 (2003) 50–51. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9712264>.
- [162] M.C. Marcotullio, C. Santi, G.N.O.-M. Mwankie, M. Curini, Chemical Composition of the Essential Oil of *Commiphora erythraea*, *Nat. Prod. Commun.* 4 (2009) 1934578X0900401. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900401227>.
- [163] M. Ljaljević Grbić, N. Unković, I. Dimkić, P. Janačković, M. Gavrilović, O. Stanojević, M. Stupar, L. Vujisić, A. Jelikić, S. Stanković, J. Vukojević, Frankincense and myrrh essential oils and burn incense fume against micro-inhabitants of sacral ambients. Wisdom of the ancients?, *J. Ethnopharmacol.* 219 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.03.003>.
- [164] Y. Chen, C. Zhou, Z. Ge, Y. Liu, Y. Liu, W. Feng, S. Li, G. Chen, T. Wei, Composition and potential anticancer activities of essential oils obtained from myrrh and frankincense, *Oncol. Lett.* 6 (2013) 1140–1146. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1520>.
- [165] S. de Rapper, S.F. Van Vuuren, G.P.P. Kamatou, A.M. Viljoen, E. Dagne, The additive and synergistic antimicrobial effects of select frankincense and myrrh oils - a combination from the pharaonic pharmacopoeia: The antimicrobial effects of frankincense and myrrh oils, *Lett. Appl. Microbiol.* 54 (2012) 352–358. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03216.x>.
- [166] A.A. Mohamed, S.I. Ali, F.K. EL-Baz, A.K. Hegazy, M.A. Kord, Chemical composition of essential oil and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of *Commiphora myrrha* resin, *Ind. Crops Prod.* 57 (2014) 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.017>.
- [167] A. Dekebo, E. Dagne, O. Sterner, Furanosesquiterpenes from *Commiphora sphaerocarpa* and related adulterants of true myrrh, *Fitoterapia.* 73 (2002) 48–55. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00367-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00367-7).

- [168] A. Maradufu, J.D. Warthen, Furanosesquiterpenoids from *Commiphora myrrh* oil, *Plant Sci.* 57 (1988) 181–184. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(88\)90085-4](https://doi.org/10.1016/0168-9452(88)90085-4).
- [169] C.H. Brieskorn, P. Noble, Two furanoeudesmanes from the essential oil of myrrh, *Phytochemistry.* 22 (1983) 187–189. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80085-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80085-0).
- [170] Başer, B. Demirci, A. Dekebo, Ermias Dagne, Essential oils of some *Boswellia spp.*, Myrrh and Opopanax, *Flavour Fragr. J.* 18 (2003) 153–156. <https://doi.org/10.1002/ffj.1166>.
- [171] B. Marongiu, A. Piras, S. Porcedda, A. Scorciapino, Chemical Composition of the Essential Oil and Supercritical CO₂ sub Extract of *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. and of *Acorus calamus* L., *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 7939–7943. <https://doi.org/10.1021/jf051100x>.
- [172] L.O. Hanus, T. Rezanka, V.M. Dembitsky, A. Moussaieff, Myrrh - *Commiphora* chemistry, *Biomed. Pap.* 149 (2005) 3–28. <https://doi.org/10.5507/bp.2005.001>.
- [173] V.D. Patil, U.R. Nayak, S. Dev, Chemistry of ayurvedic crude drugs—II, *Tetrahedron.* 29 (1973) 341–348. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)93299-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)93299-5).
- [174] V.D. Patil, U.R. Nayak, S. Dev, Chemistry of Ayurvedic crude drugs—I, *Tetrahedron.* 28 (1972) 2341–2352. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)93577-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)93577-X).
- [175] V. Kumar, S. Dev, Chemistry of Ayurvedic Crude Drugs — VIII1Part VI, *Indian J. Chem.*, in press. guggulu (Resin From *Commiphora Mukul*) —6, *Tetrahedron.* 43 (1987) 5933–5948. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)87799-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)87799-1).
- [176] A.G. Bajaj, S. Dev, Chemistry of ayurvedic crude drugs—V, *Tetrahedron.* 38 (1982) 2949–2954. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(82\)85024-2](https://doi.org/10.1016/0040-4020(82)85024-2).
- [177] J. Francis, S. Raja, M. Nair, Bioactive Terpenoids and Guggulosteroids from *Commiphora mukul* Gum Resin of Potential Anti-Inflammatory Interest, *Chem. Biodivers.* 1 (2004) 1842–1853. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200490138>.
- [178] M. Meselhy, Inhibition of LPS-induced NO production by the oleogum resin of *Commiphora wightii* and its constituents, *Phytochemistry.* 62 (2003) 213–218. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00388-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00388-6).
- [179] T. Shen, G.-H. Li, X.-N. Wang, H.-X. Lou, The genus *Commiphora*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology, *J. Ethnopharmacol.* 142 (2012) 319–330. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.025>.
- [180] A. Maradufu, Furanosesquiterpenoids of *Commiphora erythraea* and *C. myrrh*, *Phytochemistry.* 21 (1982) 677–680. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(82\)83164-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(82)83164-6).
- [181] J.F. Carroll, A. Maradufu, J.D. Warthen, An extract of *Commiphora erythraea*: a repellent and toxicant against ticks, *Entomol. Exp. Appl.* 53 (1989) 111–116. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1989.tb01294.x>.
- [182] L. Dong, D.-P. Qin, Q.-Q. Di, Y. Liu, W.-L. Chen, S.-M. Wang, Y.-X. Cheng, Commiphorines A and B, unprecedented sesquiterpenoid dimers from *Resina Commiphora* with striking activities on anti-inflammation and lipogenesis inhibition, *Org. Chem. Front.* 6 (2019) 3825–3833. <https://doi.org/10.1039/C9QO01046G>.

- [183] I. Kimura, M. Yoshikawa, S. Kobayashi, Y. Sugihara, M. Suzuki, H. Oominami, T. Murakami, H. Matsuda, V.V. Doiphode, New triterpenes, myrrhanol A and myrrhanone A, from guggul-gum resins, and their potent anti-inflammatory effect on adjuvant-induced air-pouch granuloma of mice, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (2001) 985–989. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00111-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00111-1).
- [184] E. Rubegeta, A. Ahmad, G.P.P. Kamatou, M. Sandasi, H. Sommerlatte, A.M. Viljoen, Headspace analysis, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of seven selected African *Commiphora* species, *South Afr. J. Bot.* 122 (2019) 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.03.001>.
- [185] M.S. Alhussaini, A.M. Saadabi, M.I. Alghonaim, K.E. Ibrahim, An Evaluation of the Antimicrobial Activity of *Commiphora myrrha* Nees (Engl.) Oleo-gum Resins from Saudi Arabia, *J. Med. Sci.* 15 (2015) 198–203. <https://doi.org/10.3923/jms.2015.198.203>.
- [186] S. Caparrotta, D. Comparini, E. Marone, R. Kimmenfield, L. Luzziatti, C. Taiti, S. Mancuso, Correlation between VOC fingerprinting and antimicrobial activity of several essential oils extracted by plant resins against *A. tumefaciens* and *P. savastanoi*, *Flavour Fragr. J.* 34 (2019) 377–387. <https://doi.org/10.1002/ffj.3518>.
- [187] M.C. Marcotullio, F. Messina, M. Curini, A. Macchiarulo, M. Cellanetti, D. Ricci, L. Giamperi, A. Bucchini, A. Minelli, A.L. Mierla, I. Bellezza, Protective Effects of *Commiphora erythraea* Resin Constituents Against Cellular Oxidative Damage, *Molecules.* 16 (2011) 10357–10369. <https://doi.org/10.3390/molecules161210357>.
- [188] J. Wanner, E. Schmidt, S. Bail, L. Jirovetz, G. Buchbauer, V. Gochev, T. Girova, T. Atanasova, A. Stoyanova, Chemical Composition and Antibacterial Activity of Selected Essential Oils and Some of Their Main compounds, *Nat. Prod. Commun.* 5 (2010) 1934578X1000500. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500905>.
- [189] Hasegawa, T., Matsunaga, T., Yamada, H., Aroma profile of Myrrh and its thermal variation, *J. Chem. Chem. Eng.* 8 (2014) 112–117.
- [190] Wilson A, Mookherjee BD., Characterization of aroma donating components of myrrh., in: Singapore, 1983: p. P.400.
- [191] D.F. Frazão, J.R. Raimundo, J.L. Domingues, C. Quintela-Sabarís, J.C. Gonçalves, F. Delgado, *Cistus ladanifer* (*Cistaceae*) : a natural resource in Mediterranean-type ecosystems, *Planta.* 247 (2018) 289–300. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2825-2>.
- [192] P.B. Gomes, V.G. Mata, A.E. Rodrigues, Characterization of the Portuguese-Grown *Cistus ladanifer* Essential Oil, *J. Essent. Oil Res.* 17 (2005) 160–165. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698864>.
- [193] J.P. Mariotti, F. Tomi, J. Casanova, J. Costa, A.F. Bernardini, Composition of the Essential Oil of *Cistus ladaniferus* L. Cultivated in Corsica (France), *Flavour Fragr. J.* 12 (1997) 5.
- [194] R. Königs, P.-G. Gülz, Die monoterpene im ätherischen öl der blätter von *Cistus ladaniferus* L., *Z. Für Pflanzenphysiol.* 72 (1974) 237–248. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(74\)80053-X](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(74)80053-X).
- [195] C. Robles, A. Bousquet-Mélou, S. Garzino, G. Bonin, Comparison of essential oil composition of two varieties of *Cistus ladanifer*, *Biochem. Syst. Ecol.* 31 (2003) 339–343. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00161-8](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00161-8).

- [196] P. Weyerstahl, H. Marschall, M. Weirauch, K. Thefeld, H. Surburg, Constituents of commercial Labdanum oil, *Flavour Fragr. J.* 13 (1998) 295–318. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(1998090\)13:5<295::AID-FFJ751>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(1998090)13:5<295::AID-FFJ751>3.0.CO;2-I).
- [197] J.T.D. Pascual-, J.G. Urones, M. gonzalez, Terpenoides monohidroxilados de la gomorresina de *Cistus ladaniferus*, *An. Quím.* (1977) 1024–1028.
- [198] J.D. Cocker, T.G. Halsall, 820. The chemistry of gum labdanum. Part II. The structure of labdanolic acid, *J. Chem. Soc. Resumed.* (1956) 4262. <https://doi.org/10.1039/jr9560004262>.
- [199] J.T.D. Pascual-, I.S. Bellido, P. Basabe, I.S. Marcos, I.F. Ruano, J.G. Urones, Labdane diterpenoids from *Cistus ladaniferus*, *Phytochemistry.* 21 (1982) 899–901. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(82\)80089-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(82)80089-7).
- [200] D.F. Frazão, C. Martins-Gomes, J.L. Steck, J. Keller, F. Delgado, J.C. Gonçalves, M. Bunzel, C.M.B.S. Pintado, T.S. Díaz, A.M. Silva, Labdanum Resin from *Cistus ladanifer* L.: A Natural and Sustainable Ingredient for Skin Care Cosmetics with Relevant Cosmeceutical Bioactivities, *Plants.* 11 (2022) 1477. <https://doi.org/10.3390/plants11111477>.
- [201] N. B. Garnier, E. Dodinet, Une offrande de ciste dans une tombe carthaginoise (VIe-Ve s. av. J.-C.). Une approche interdisciplinaire alliant archéo-ethnobotanique et chimie organique analytique, *Archeosciences Rev. Archéom.* (2013). <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01933862>.
- [202] M. El Kabbaoui, A. Chda, O. Azdad, N. Mejrhit, L. Aarab, R. Bencheikh, A. Tazi, Evaluation of hypoglycemic and hypolipidemic activities of aqueous extract of *Cistus ladaniferus* in streptozotocin-induced diabetic rats, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6 (2016) 1044–1049. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.09.005>.
- [203] A. El Hamsas El Youbi, L. El Mansouri, S. Boukhira, A. Daoudi, D. Bousta, In Vivo Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of Aqueous Extract of *Cistus ladanifer* L. From Morocco, *Am. J. Ther.* 23 (2016) e1554–e1559. <https://journals.lww.com/00045391-201611000-00040> (accessed September 26, 2022).
- [204] N. Benayad, Z. Mennane, R. Charof, A. Hakiki, M. Mosaddak, Antibacterial activity of essential oil and some extracts of *Cistus ladaniferus* from Oulmes in Morocco, (2013) 6.
- [205] E. Guinoiseau, A. Luciani, D. de R. Serra, Y. Quilichini, L. Berti, V. Lorenzi, Primary Mode of Action of *Cistus ladaniferus* L. Essential Oil Active Fractions on *Staphylococcus aureus* Strain, *Adv. Microbiol.* 05 (2015) 881–890. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.513092>.
- [206] E. Barrajón-Catalán, S. Fernández-Arroyo, D. Saura, E. Guillén, A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura-Carretero, V. Micol, Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 2273–2282. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.060>.
- [207] K. Gawel-Bęben, W. Kukula-Koch, U. Hoian, M. Czop, M. Strzypek-Gomółka, B. Antosiewicz, Characterization of *Cistus × incanus* L. and *Cistus ladanifer* L. Extracts as Potential Multifunctional Antioxidant Ingredients for Skin Protecting Cosmetics, *Antioxidants.* 9 (2020) 202. <https://doi.org/10.3390/antiox9030202>.
- [208] P.S. Ramalho, V.A.P. de Freitas, A. Macedo, G. Silva, A.M.S. Silva, Volatile components of *Cistus ladanifer* leaves, *Flavour Fragr. J.* 14 (1999) 300–302. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-)

1026(199909/10)14:5<300::AID-FFJ830>3.0.CO;2-X.

[209] Ohloff, Günther, Pickenhagen, Wilhelm, Kraft, Philip, Scent and chemistry, The molecular world of odors, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, Switzerland, 2012.

[210] J. Francis, S. Raja, M. Nair, Bioactive Terpenoids and Guggulosteroids from Commiphora mukul Gum Resin of Potential Anti-Inflammatory Interest, Chem. Biodivers. 1 (2004) 1842–1853. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200490138>.

[211] J.-H. Koo, K.-S. Rhee, H.-W. Koh, H.-Y. Jang, B.-H. Park, J.-W. Park, Guggulsterone inhibits melanogenesis in B16 murine melanoma cells by downregulating tyrosinase expression, Int. J. Mol. Med. 30 (2012) 974–978. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1057>.

[212] B.-Z. Yu, R. Kaimal, S. Bai, K.A. El Sayed, S.A. Tatulian, R.J. Apitz, M.K. Jain, R. Deng, O.G. Berg, Effect of Guggulsterone and Cembranoids of *Commiphora mukul* on Pancreatic Phospholipase A2 : Role in Hypocholesterolemia, J. Nat. Prod. 72 (2009) 24–28. <https://doi.org/10.1021/np8004453>.

[213] S. Ahmad, S.A. Khan, A. Kindelin, T. Mohseni, K. Bhatia, M.N. Hoda, A.F. Ducruet, Acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA) Attenuates Oxidative Stress, Inflammation, Complement Activation and Cell Death in Brain Endothelial Cells Following OGD/Reperfusion, NeuroMolecular Med. 21 (2019) 505–516. <https://doi.org/10.1007/s12017-019-08569-z>.

[214] J.-J. Liu, Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells, Carcinogenesis. 23 (2002) 2087–2093. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.12.2087>.

[215] H. Ammon, Boswellic Acids in Chronic Inflammatory Diseases, Planta Med. 72 (2006) 1100–1116. <https://doi.org/10.1055/s-2006-947227>.

[216] B.A. Shah, A. Kumar, P. Gupta, M. Sharma, V.K. Sethi, A.K. Saxena, J. Singh, G.N. Qazi, S.C. Taneja, Cytotoxic and apoptotic activities of novel amino analogues of boswellic acids, Bioorg. Med. Chem. Lett. 17 (2007) 6411–6416. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.011>.

[217] M. Ota, P.J. Houghton, Boswellic Acids with Acetylcholinesterase Inhibitory Properties from Frankincense, Nat. Prod. Commun. 3 (2008) 1934578X0800300. <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300105>.

[218] F. Iram, S.A. Khan, A. Husain, Phytochemistry and potential therapeutic actions of Boswellic acids: A mini-review, Asian Pac. J. Trop. Biomed. 7 (2017) 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.05.001>.

[219] B.A. Shah, G.N. Qazi, S.C. Taneja, Boswellic acids: a group of medicinally important compounds, Nat Prod Rep. 26 (2009) 72–89. <https://doi.org/10.1039/B809437N>.

[220] A. Meybeck, A. Zanvit, Utilisation de l'acide 3-0-acétyl 11-céto-boswellique ou d'un extrait végétal en contenant, pour réduire les rides d'expression, EP 1 442 736 A1, n.d. https://worldwide.espacenet.com/patent/original-document?channel=espacenet_channel-7193a912-ece4-4a95-b3a6-a707bd81fde8.

[221] H.P.T. Ammon, Utilisation d'acides boswelliques pour la prévention et/ou le traitement des lésions et/ou de l'inflammation des îlots de Langerhans, EP2433629A1, 2012.

<https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/043061397/publication/EP2433629A1?q=pn%3DEP2433629A1>.

[222] T. Simmet, H.P.T. Ammon, Utilisation d'acide boswellique pour le traitement des tumeurs du cerveau., WO9619212A1, 1996.

<https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/006536548/publication/WO9619212A1?q=pn%3DWO9619212A1>.

[223] D. Kubmarawa, I.A. Ogunwande, D.A. Okorie, N.O. Olawore, A.A. Kasali, Constituents of the Essential Oils of *Boswellia dalzielii* Hutch. from Nigeria, J. Essent. Oil Res. 18 (2006) 119–120.

<https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699038>.

[224] N. Nwude, M.A. Ibrahim, Plants used in traditional veterinary medical practice in Nigeria, J. Vet. Pharmacol. Ther. 3 (1980) 261–273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1980.tb00491.x>.

[225] F.C. Nwinyi, L. Binda, G.S. Ajoku, S.O. Aniagu, N.M. Enwerem, A. Orisadipe, D. Kubmarawa, K.S. Gamaniel, Evaluation of the aqueous extract of *Boswellia dalzielii* stem bark for antimicrobial activities and gastrointestinal effects, Afr. J. Biotechnol. 3 (2004) 284–288.

<https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2052>.

[226] H.S. Hassan, J. Yau, J. Abubakar, A. Ahmadu, Phytochemical, analgesic and anti-inflammatory studies of the methanol leaf extract of *Commiphora mollis* (Oliv.) Engl.(Burseraceae), Niger. J. Pharm. Res. 13 (2017) 137–146.

[227] M.J. Kohoude, F. Gbaguidi, P. Agbani, M.-A. Ayedoun, S. Cazaux, J. Bouajila, Chemical composition and biological activities of extracts and essential oil of *Boswellia dalzielii* leaves, Pharm. Biol. 55 (2017) 33–42. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1226356>.

[228] A. DeCarlo, S. Johnson, K.I. Okeke-Agulu, N.S. Dosoky, S.J. Wax, M.S. Owolabi, W.N. Setzer, Compositional analysis of the essential oil of *Boswellia dalzielii* frankincense from West Africa reveals two major chemotypes, Phytochemistry. 164 (2019) 24–32.

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.04.015>.

[229] L. Camarda, T. Dayton, V. Di Stefano, R. Pitonzo, D. Schillaci, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Some Oleogum Resin Essential Oils from *Boswellia spp.* (Burseraceae), Ann. Chim. 97 (2007) 837–844. <https://doi.org/10.1002/adic.200790068>.

[230] S. Al-Saidi, K.B. Rameshkumar, A. Hisham, N. Sivakumar, S. Al-Kindy, Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oils of Four Commercial Grades of Omani Luban, the Oleo-Gum Resin of *Boswellia sacra*Flueck., Chem. Biodivers. 9 (2012) 615–624.

<https://doi.org/10.1002/cbdv.201100189>.

[231] Getachew M. Fanta, Asnake G. Ede, Aman Dekebo, Biocide Value Characterization of Essential Oil from *Boswellia neglecta* S. against Pathogenic Termite, Cockroach, Ticks, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, Int. J. Mod. Chem. (2013) 145–158.

[232] H. Bakthir, N. Awadh Ali, N. Awadh Ali, N. Arnold, N. Arnold, A. Teichert, A. Teichert, L. Wessjohann, L. Wessjohann, Anticholinesterase activity of endemic plant extracts from Soqatra, Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. 8 (2011). <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i3.65292>.

[233] M. Duwiejua, I. Zeitlin, P. Waterman, J. Chapman, G. Mhango, G. Provan, Anti-Inflammatory Activity of Resins from some Species of the Plant Family *Burseraceae*, Planta Med. 59 (1993) 12–16.

<https://doi.org/10.1055/s-2006-959594>.

- [234] I. M., Adebisi, A. Abubakar, K. Abubakar, T. R., . G., Analgesic effect and anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Boswellia dalzielii* (*Burseraceae*) stem bark, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 10 (2018) 139. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2018v10i4.26156>.
- [235] E.U.E. E.U. Etuk, B.M. Agaie, P.A. Onyeyili, C.U. Ottah, Anti-diarrhoea Effect of *Boswellia dalzielii* Stem Bark Extract in Albino Rats, *J. Pharmacol. Toxicol.* 1 (2006) 591–596. <https://doi.org/10.3923/jpt.2006.591.596>.
- [236] G.G. Allan, Synthesis of δ -boswellic acid, *Phytochemistry.* 8 (1969) 2083–2085. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88098-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88098-X).
- [237] A. Winterstein, G. Stein, Untersuchungen in der Saponinreihe. X. Mitteilung. Zur Kenntnis der Mono-oxy-triterpensäuren., *Hoppe-Seyler's Z. Für Physiol. Chem.* 208 (1932) 9–25. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1932.208.1-3.9>.
- [238] N. Banno, T. Akihisa, K. Yasukawa, H. Tokuda, K. Tabata, Y. Nakamura, R. Nishimura, Y. Kimura, T. Suzuki, Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*, *J. Ethnopharmacol.* 107 (2006) 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.006>.
- [239] Y.S. Park, J.H. Lee, J.A. Harwalkar, J. Bondar, H. Safayhi, M. Golubic, Acetyl-11-Keto- β -Boswellic Acid (Akba) is Cytotoxic for Meningioma Cells and Inhibits Phosphorylation of the Extracellular-Signal Regulated Kinase 1 and 2, in: K.V. Honn, L.J. Marnett, S. Nigam, E. Dennis, C. Serhan (Eds.), *Eicosanoids Bioact. Lipids Cancer Inflamm. Radiat. Inj.* 5, Springer US, Boston, MA, 2002: pp. 387–393. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0193-0_60.
- [240] S.I. Ali, C.-R. Zhang, A.A. Mohamed, F.K. EL-Baz, A.K. Hegazy, M.A. Kord, M.G. Nair, Major Constituents of *Boswellia Carteri* Resin Exhibit Cyclooxygenase Enzyme Inhibition and Antiproliferative Activity, *Nat. Prod. Commun.* 8 (2013) 1934578X1300801. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300801005>.
- [241] Y. Shao, C.-T. Ho, C.-K. Chin, V. Badmaev, W. Ma, M.-T. Huang, Inhibitory Activity of Boswellic Acids from *Boswellia serrata* against Human Leukemia HL-60 Cells in Culture, *Planta Med.* 64 (1998) 328–331. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957444>.
- [242] G.E. Ronsein, N. Pamir, P.D. von Haller, D.S. Kim, M.N. Oda, G.P. Jarvik, T. Vaisar, J.W. Heinecke, Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) exhibit comparable linearity, dynamic range and precision for targeted quantitative HDL proteomics, *J. Proteomics.* 113 (2015) 388–399. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.10.017>.
- [243] N. Rauniyar, Parallel Reaction Monitoring: A Targeted Experiment Performed Using High Resolution and High Mass Accuracy Mass Spectrometry, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 28566–28581. <https://doi.org/10.3390/ijms161226120>.
- [244] M. Bader, A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis, *J. Chem. Educ.* 57 (1980) 703–706. <https://doi.org/10.1021/ed057p703>.
- [245] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Sci. Technol.* 28 (1995) 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

- [246] H. Plainfossé, P. Burger, S. Azoulay, A. Landreau, G. Verger-Dubois, X. Fernandez, Development of a Natural Anti-Age Ingredient Based on *Quercus pubescens* Willd. Leaves Extract—A Case Study, *Cosmetics*. 5 (2018) 15. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010015>.
- [247] S. Granica, M.E. Czerwińska, J.P. Piwowarski, M. Ziaja, A.K. Kiss, Chemical Composition, Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Extracts Prepared from Aerial Parts of *Oenothera biennis* L. and *Oenothera paradoxa* Hudziok Obtained after Seeds Cultivation, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 801–810. <https://doi.org/10.1021/jf304002h>.
- [248] O. Nerya, J. Vaya, R. Musa, S. Izrael, R. Ben-Arie, S. Tamir, Glabrene and Isoliquiritigenin as Tyrosinase Inhibitors from Licorice Roots, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1201–1207. <https://doi.org/10.1021/jf020935u>.
- [249] S.H. Pomerantz, Separation, purification, and properties of two tyrosinases from hamster melanoma, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 2351–2357.
- [250] M. Chatatikun, A. Chiabchalard, Thai plants with high antioxidant levels, free radical scavenging activity, anti-tyrosinase and anti-collagenase activity, *BMC Complement. Altern. Med.* 17 (2017) 487. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1994-7>.
- [251] R. Cannell, S. Kellam, A. Owsianka, J. Walker, Results of a Large Scale Screen of Microalgae for the Production of Protease Inhibitors, *Planta Med.* 54 (1988) 10–14. <https://doi.org/10.1055/s-2006-962319>.
- [252] G.D. Liyanaarachchi, J.K.R.R. Samarasekera, K.R.R. Mahanama, K.D.P. Hemalal, Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals, *Ind. Crops Prod.* 111 (2018) 597–605. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.019>.
- [253] J. Niebler, A. Buettner, Frankincense Revisited, Part I: Comparative Analysis of Volatiles in Commercially Relevant *Boswellia* Species, *Chem. Biodivers.* 13 (2016) 613–629. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500329>.
- [254] M. Russell, I.A. Southwell, P.G. Waterman, α -Phellandren-8-ol, a Rare Monoterpenene Alcohol from the Oil of *Prostanthera staurophylla* F. Muell., *J. Essent. Oil Res.* 13 (2001) 446–447. <https://doi.org/10.1080/10412905.2001.9699723>.
- [255] S.K. Singh, S. Bhusari, R. Singh, A. Saxena, D. Mondhe, G.N. Qazi, Effect of acetyl 11-keto β -boswellic acid on metastatic growth factor responsible for angiogenesis, *Vascul. Pharmacol.* 46 (2007) 333–337. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.09.008>.
- [256] D. Taherzadeh, V. Baradaran Rahimi, H. Amiri, S. Ehtiati, R. Yahyazadeh, S.I. Hashemy, V.R. Askari, Acetyl-11-Keto- β -Boswellic Acid (AKBA) Prevents Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Cytotoxicity on H9C2 Cells, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2022 (2022) 1–10. <https://doi.org/10.1155/2022/2620710>.
- [257] Y. Takada, H. Ichikawa, V. Badmaev, B.B. Aggarwal, Acetyl-11-Keto- β -Boswellic Acid Potentiates Apoptosis, Inhibits Invasion, and Abolishes Osteoclastogenesis by Suppressing NF- κ B and NF- κ B-Regulated Gene Expression, *J. Immunol.* 176 (2006) 3127–3140. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.3127>.
- [258] N.A. Hosain, R. Ghosh, D.L. Bryant, B.A. Arivett, A.L. Farone, P.C. Kline, Isolation, structure elucidation, and immunostimulatory activity of polysaccharide fractions from *Boswellia carterii*

- frankincense resin, *Int. J. Biol. Macromol.* 133 (2019) 76–85.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.059>.
- [259] J. Wang, S. Hu, S. Nie, Q. Yu, M. Xie, Reviews on Mechanisms of *In Vitro* Antioxidant Activity of Polysaccharides, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016 (2016) 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/5692852>.
- [260] M.X. Chang, F. Xiong, Astaxanthin and its Effects in Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases: Recent Advances and Future Directions, *Molecules.* 25 (2020) 5342. <https://doi.org/10.3390/molecules25225342>.
- [261] P. Michel, A. Owczarek, M. Matczak, M. Kosno, P. Szymański, E. Mikiciuk-Olasik, A. Kilanowicz, W. Wesołowski, M. Olszewska, Metabolite Profiling of Eastern Teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) Lipophilic Leaf Extracts with Hyaluronidase and Lipoxygenase Inhibitory Activity, *Molecules.* 22 (2017) 412. <https://doi.org/10.3390/molecules22030412>.
- [262] H. Safayhi, T. Mack, J. Sabieraj, M.I. Anazodo, L.R. Subramanian, H.P. Ammon, Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261 (1992) 1143–1146. <http://jpet.aspetjournals.org/content/261/3/1143> (accessed October 22, 2019).
- [263] H. Safayhi, E.-R. Sailer, Anti-Inflammatory Actions of Pentacyclic Triterpenes, *Planta Med.* 63 (1997) 487–493. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957748>.
- [264] A.-B. Cutillas, A. Carrasco, R. Martinez-Gutierrez, V. Tomas, J. Tudela, Thyme essential oils from Spain: Aromatic profile ascertained by GC–MS, and their antioxidant, anti-lipoxygenase and antimicrobial activities, *J. Food Drug Anal.* 26 (2018) 529–544. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.05.004>.
- [265] L. Zou, Y. Zhang, W. Li, J. Zhang, D. Wang, J. Fu, P. Wang, Comparison of Chemical Profiles, Anti-Inflammatory Activity, and UPLC-Q-TOF/MS-Based Metabolomics in Endotoxic Fever Rats between Synthetic Borneol and Natural Borneol, *Molecules.* 22 (2017) 1446. <https://doi.org/10.3390/molecules22091446>.
- [266] A.M. Alvi, L.T. Al Kury, A. Alattar, I. Ullah, A.J. Muhammad, R. Alshaman, F.A. Shah, A.U. Khan, J. Feng, S. Li, Carveol Attenuates Seizure Severity and Neuroinflammation in Pentylene-tetrazole-Kindled Epileptic Rats by Regulating the Nrf2 Signaling Pathway, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021 (2021) 1–19. <https://doi.org/10.1155/2021/9966663>.
- [267] M.G.B. Oliveira, R.B. Marques, M.F. Santana, A.B.D. Santos, F.A. Brito, E.O. Barreto, D.P. Sousa, F.R.C. Almeida, D. Badauê-Passos, Â.R. Antonioli, L.J. Quintans-Júnior, α -Terpineol Reduces Mechanical Hypernociception and Inflammatory Response, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* (2012) n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2012.00875.x>.
- [268] B.S. Gomes, B.P.S. Neto, E.M. Lopes, F.V.M. Cunha, A.R. Araújo, C.W.S. Wanderley, D.V.T. Wong, R.C.P.L. Júnior, R.A. Ribeiro, D.P. Sousa, J. Venes R Medeiros, R.C.M. Oliveira, F.A. Oliveira, Anti-inflammatory effect of the monoterpene myrtenol is dependent on the direct modulation of neutrophil migration and oxidative stress, *Chem. Biol. Interact.* 273 (2017) 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.05.019>.
- [269] F. Fenanir, A. Semmeq, Y. Benguerba, M. Badawi, M.-A. Dziurla, S. Amira, H. Laouer, *In silico* investigations of some *Cyperus rotundus* compounds as potential anti-inflammatory inhibitors of 5-LO and LTA4H enzymes, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2021) 1–16. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1960197>.

- [270] N. Kaur, K.K. Chahal, A. Kumar, R. Singh, U. Bhardwaj, Antioxidant activity of *Anethum graveolens* L. essential oil constituents and their chemical analogues, *J. Food Biochem.* 43 (2019) e12782. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12782>.
- [271] M. Assefa, A. Dekebo, H. Kassa, A. Habtu, G. Fitwi, M. Redi-Abshiro, Biophysical and Chemical Investigations of Frankincense of *Boswellia papyrifera* from North and Northwestern Ethiopia, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* 4 (2012) 1074–1089.
- [272] G. Huang, J. Yang, L. Zhang, L. Cao, M. Zhang, X. Niu, Z. Zhou, X. Zhang, P. Li, J.F. Liu, Inhibitory effect of 11-carboxyl-beta-boswellic acid on non-small cell lung cancer H446 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503 (2018) 2202–2205. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.137>.
- [273] Atta-ur-Rahman, H. Naz, Fadimatou, T. Makhmoor, A. Yasin, N. Fatima, F.N. Ngounou, S.F. Kimbu, B.L. Sondengam, M.I. Choudhary, Bioactive Constituents from *Boswellia papyrifera*, *J. Nat. Prod.* 68 (2005) 189–193. <https://doi.org/10.1021/np040142x>.
- [274] S. Hamm, J. Bleton, A. Tchaplal, Headspace solid phase microextraction for screening for the presence of resins in Egyptian archaeological samples, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 235–243. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301611>.
- [275] M. Paul, G. Brüning, J. Bergmann, J. Jauch, A Thin-layer Chromatography Method for the Identification of Three Different Olibanum Resins (*Boswellia serrata*, *Boswellia papyrifera* and *Boswellia carterii*, respectively, *Boswellia sacra*): Thin-Layer Chromatography Identification Of Olibanum, *Phytochem. Anal.* 23 (2012) 184–189. <https://doi.org/10.1002/pca.1341>.
- [276] M. Jiang, C. Kulsing, P.J. Marriott, Comprehensive 2D gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry with 2D retention indices for analysis of volatile compounds in frankincense (*Boswellia papyrifera*), *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 3185–3196. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1012-z>.
- [277] C.L. Woolley, M.M. Suhail, B.L. Smith, K.E. Boren, L.C. Taylor, M.F. Schreuder, J.K. Chai, H. Casabianca, S. Haq, H.-K. Lin, A.A. Al-Shahri, S. Al-Hatmi, D.G. Young, Chemical differentiation of *Boswellia sacra* and *Boswellia carterii* essential oils by gas chromatography and chiral gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1261 (2012) 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.073>.
- [278] R.P. Adams, Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4. ed, Allured Business Media, Carol Stream, Ill, 2007.
- [279] L.O. Hanuš, A. Moussaieff, T. Řezanka, S. Abu-Lafi, V.M. Dembitsky, Phytochemical Analysis and Comparison for Differentiation of *Boswellia Carterii* and *B. Serrata*, *Nat. Prod. Commun.* 2 (2007) 1934578X0700200. <https://doi.org/10.1177/1934578X0700200206>.
- [280] B.R. Mikhaeil, G.T. Maatooq, F.A. Badria, M.M.A. Amer, Chemistry and Immunomodulatory Activity of Frankincense Oil, *Z. Für Naturforschung C.* 58 (2003) 230–238. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-3-416>.
- [281] D.J. Vanderah, N. Rutledge, F.J. Schmitz, L.S. Ciereszko, Marine natural products: cembrene-A and cembrene-C from a soft coral, *Nephthea* species, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 1614–1616. <https://doi.org/10.1021/jo00402a040>.
- [282] C. Mathe, J. Connan, P. Archier, M. Mouton, C. Vieillescazes, Analysis of Frankincense in Archaeological Samples by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Ann. Chim.* 97 (2007) 433–445.

<https://doi.org/10.1002/adlc.200790029>.

[283] J. Baeten, K. Deforce, S. Challe, D. De Vos, P. Degryse, Holy Smoke in Medieval Funerary Rites: Chemical Fingerprints of Frankincense in Southern Belgian Incense Burners, *PLoS ONE*. 9 (2014) e113142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113142>.

[284] A.O. Tucker, Frankincense and Myrrh, *Econ. Bot.* 40 (1986) 425–433. <http://www.jstor.org/stable/4254901>.

[285] J.B. Sharmeen, F.M. Mahomoodally, G. Zengin, F. Maggi, Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals, *Molecules*. 26 (2021) 666. <https://doi.org/10.3390/molecules26030666>.

[286] J. Niebler, K. Zhuravlova, M. Minceva, A. Buettner, Fragrant Sesquiterpene Ketones as Trace Constituents in Frankincense Volatile Oil of *Boswellia sacra*, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 1160–1164. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00836>.

[287] J. Niebler, A. Buettner, Frankincense Revisited, Part I: Comparative Analysis of Volatiles in Commercially Relevant *Boswellia* Species, *Chem. Biodivers.* 13 (2016) 613–629. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500329>.

[288] J. Niebler, Incense Materials, in: A. Buettner (Ed.), *Springer Handb. Odor*, Springer International Publishing, Cham, 2017: pp. 13–14. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26932-0_4.

[289] M. Mertens, A. Buettner, E. Kirchoff, The volatile constituents of frankincense - a review, *Flavour Fragr. J.* 24 (2009) 279–300. <https://doi.org/10.1002/ffj.1942>.

[290] J. Niebler, A. Buettner, Quantification of odor active compounds from *Boswellia sacra* frankincense by stable isotope dilution assays (SIDA) in combination with TDU-GC-MS, *Lebensmittelchemie*. 69 (2015) 79–83. <https://doi.org/10.1002/lemi.201590031>.

[291] M. Rychlik, S. Asam, Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 617–628. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1717-x>.

[292] A.T. San, D.C. Joyce, P.J. Hofman, A.J. Macnish, R.I. Webb, N.J. Matovic, C.M. Williams, J.J. De Voss, S.H. Wong, H.E. Smyth, Stable isotope dilution assay (SIDA) and HS-SPME-GCMS quantification of key aroma volatiles for fruit and sap of Australian mango cultivars, *Food Chem.* 221 (2017) 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.130>.

[293] E. Varga, T. Glauner, R. Köppen, K. Mayer, M. Sulyok, R. Schuhmacher, R. Krska, F. Berthiller, Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2675–2686. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5757-5>.

[294] M. Dong, L. Qin, J. Xue, M. Du, S.-Y. Lin, X.-B. Xu, B.-W. Zhu, Simultaneous quantification of free amino acids and 5'-nucleotides in shiitake mushrooms by stable isotope labeling-LC-MS/MS analysis, *Food Chem.* 268 (2018) 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.054>.

[295] A. Roland, J. Vialaret, M. Moniatte, P. Rigou, A. Razungles, R. Schneider, Validation of a nanoliquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices, *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 1626–1635. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.031>.

- [296] P. Borman, D. Elder, Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in: A. Teasdale, D. Elder, R.W. Nims (Eds.), ICH Qual. Guidel., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2017: pp. 127–166. <https://doi.org/10.1002/9781118971147.ch5>.
- [297] G. Wells, Harry Prest, Charles William Russ IV, Signal, bruit, et limites de détection en spectrométrie de masse, Agilent Technologies, Inc., 2011.
- [298] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>.
- [299] D. Harvey, Modern analytical chemistry, International ed, McGraw-Hill, Boston, 2000.
- [300] T.C. Whiting, R.H. Liu, W.-T. Chang, M.R. Bodapati, Isotopic analogues as internal standards for quantitative analyses of drugs and metabolites by GC-MS - Nonlinear Calibration Approaches, *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 11. <https://doi.org/10.1093/jat/25.3.179>.
- [301] G.S. Rule, Z.D. Clark, B. Yue, A.L. Rockwood, Correction for Isotopic Interferences between Analyte and Internal Standard in Quantitative Mass Spectrometry by a Nonlinear Calibration Function, *Anal. Chem.* 85 (2013) 3879–3885. <https://doi.org/10.1021/ac303096w>.
- [302] M.C. Marcotullio, O. Rosati, D. Lanari, Phytochemistry of *Commiphora erythraea* : A Review, *Nat. Prod. Commun.* 13 (2018) 1934578X1801300. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300925>.
- [303] G.J. Provan, A.I. Gray, P.G. Waterman, Monoterpene-rich resins from some kenyan *Burseraceae*, *Flavour Fragr. J.* 2 (1987) 115–118. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730020307>.
- [304] A. Maradufu, J.D. Warthen, Furanosesquiterpenoids from *Commiphora myrrh* oil, *Plant Sci.* 57 (1988) 181–184. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(88\)90085-4](https://doi.org/10.1016/0168-9452(88)90085-4).
- [305] A. Chaintreau, Quantitative Use of Gas Chromatography – Olfactometry: The GC-“SNIF” Method, in: R. Marsili (Ed.), *Flavor Fragr. Odor Anal.*, CRC Press, 2001. <https://doi.org/10.1201/9780203908273.ch12>.
- [306] M.A. Saeed, A.W. Sabir, Irritant potential of some constituents from oleo-gum-resin of *Commiphora myrrha*, *Fitoterapia.* 75 (2004) 81–84. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2003.08.010>.
- [307] R.B. Woodward, F.J. Brutschy, H. Baer, The Structure of Santonic Acid, *J. Am. Chem. Soc.* 70 (1948) 4216–4221. <https://doi.org/10.1021/ja01192a070>.
- [308] R.B. Woodward, Peter. Yates, The Structure of γ -Metasantonin, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 551–553. <https://doi.org/10.1021/ja00888a015>.
- [309] E. Barrajon-Catalán, L. Tomás-Menor, A. Morales-Soto, N.M. Bruñá, D.S. López, A. Segura-Carretero, V. Micol, Rockroses (*Cistus* sp.) Oils, in: *Essent. Oils Food Preserv. Flavor Saf.*, Elsevier, 2016: pp. 649–658. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00074-2>.
- [310] F.N. Howes, Age-Old resins of the Mediterranean region and their uses, *Econ. Bot.* 4 (1950) 307–316. <https://doi.org/10.1007/BF02985086>.
- [311] J.D. Cocker, T.G. Halsall, A. Bowers, 819. The chemistry of gum labdanum. Part I. Some acidic constituents, *J. Chem. Soc. Resumed.* (1956) 4259. <https://doi.org/10.1039/jr9560004259>.
- [312] J. Niebler, Incense Materials, in: A. Buettner (Ed.), *Springer Handb. Odor*, Springer International

- Publishing, Cham, 2017: pp. 13–14. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26932-0_4.
- [313] K. Kuchta, K. Grötzing, C. Birkemeyer, H. Rauwald, Labdanum from mediterranean *Cistus* species: GC-MS fingerprints and relative quantification of antispirochaetal manoyloxides, *Planta Med.* 78 (2012) s-0032-1320325. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1320325>.
- [314] D.F. Frazão, C. Martins-Gomes, J.L. Steck, J. Keller, F. Delgado, J.C. Gonçalves, M. Bunzel, C.M.B.S. Pintado, T.S. Díaz, A.M. Silva, Labdanum Resin from *Cistus ladanifer* L.: A Natural and Sustainable Ingredient for Skin Care Cosmetics with Relevant Cosmeceutical Bioactivities, *Plants*. 11 (2022) 1477. <https://doi.org/10.3390/plants11111477>.
- [315] D. Andrade, C. Gil, L. Breitenfeld, F. Domingues, A.P. Duarte, Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L., *Ind. Crops Prod.* 30 (2009) 165–167. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.01.009>.
- [316] J.L. Oller-López, R. Rodríguez, J.M. Cuerva, J.E. Oltra, B. Bazdi, A. Dahdouh, A. Lamarti, A.I. Mansour, Composition of the Essential Oils of *Cistus ladaniferus* and *C. monspeliensis* from Morocco, *J. Essent. Oil Res.* 17 (2005) 553–555. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698992>.
- [317] S. Teixeira, A. Mendes, A. Alves, L. Santos, Simultaneous distillation–extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladanifer* L., *Anal. Chim. Acta.* 584 (2007) 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.11.054>.
- [318] S. Fernández-Arroyo, E. Barrajon-Catalán, V. Micol, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract: Identification of Phenolic Compounds from *Cistus Ladanifer*, *Phytochem. Anal.* 21 (2010) 307–313. <https://doi.org/10.1002/pca.1200>.
- [319] J.T.D. Pascual-, J.G. Urones, P. Basabe, F.H. aubanell, Componentes minoritarios de *Cistus ladaniferus* L., *An. Quím.* (1979) 335–340.
- [320] A. Girard, G. Sandulesco, Sur une nouvelle série de réactifs du groupe carbonyle, leur utilisation à l'extraction des substances cétoniques et à la caractérisation microchimique des aldéhydes et cétones, *Helv. Chim. Acta.* 19 (1936) 1095–1107. <https://doi.org/10.1002/hlca.193601901148>.
- [321] N. Baldovini, J.-J. Filippi, Natural Fragrant Raw Materials, in: A. Buettner (Ed.), Springer Handb. Odor, Springer International Publishing, Cham, 2017: pp. 11–12. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26932-0_3.
- [322] I.C. Nigam, G.A. Neville, Essential oils and their constituents part XLI. Identification of sesquiterpene hydrocarbons in oil of opoponax, *J. Chromatogr. A.* 34 (1968) 85–88. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(68\)80015-9](https://doi.org/10.1016/0021-9673(68)80015-9).
- [323] A.F. Regan, B.R. Andrews, Gas chromatography of sesquiterpene hydrocarbons, *J. Chromatogr. A.* 31 (1967) 209. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)86044-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)86044-1).
- [324] J.A. Wenninger, R.L. Yates, Constituents of Opoponax Oil: Sesquiterpene Hydrocarbons, *J. AOAC Int.* 52 (1969) 1155–1161. <https://doi.org/10.1093/jaoac/52.6.1155>.
- [325] C. Heinz Brieskorn, P. Noble, Furanosquiterpenes from the essential oil of myrrh, *Phytochemistry.* 22 (1983) 1207–1211. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80223-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80223-4).

- [326] C.H. Brieskorn, P. Noble, Drei neue furanogermacrene aus myrrhe, *Tetrahedron Lett.* 21 (1980) 1511–1514. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)92760-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)92760-6).
- [327] B. Abegaz, E. Dagne, C. Bates, P.G. Waterman, Monoterpene-rich resins from two ethiopian species of *commiphora*, *Flavour Fragr. J.* 4 (1989) 99–101. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730040303>.
- [328] L. Manguro, K. Mukonyi, J. Githiomi, Bisabolenes and Furanosesquiterpenoids of Kenyan *Commiphora kua* Resin, *Planta Med.* 62 (1996) 84–85. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957815>.
- [329] A. Bouville, G. Erlich, S. Azoulay, X. Fernandez, Forgotten Perfumery Plants – Part I: Balm of Judea, *Chem. Biodivers.* 16 (2019). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900506>.
- [330] S. Varamini, A. Sakhteman, G. Yousefi, M. Sepehri, P. Faridi, M. Zarshenas, Volatile composition analysis of five different *Commiphora mukul* (Hook. ex Stocks) Engl. gum samples, *Trends Pharm. Sci.* 2 (2016) 219–222. <https://doi.org/10.1111/TIPS.V2I3.91>.
- [331] P. Maděra, Z. Paschová, A. Ansorgová, B. Vrškový, S. Lvončík, H. Habrová, Volatile Compounds in Oleo-gum Resin of Socotran Species of *Burseraceae*, *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* 65 (2017) 73–90. <https://doi.org/10.11118/actaun201765010073>.
- [332] A. Bhatia, S.K. Bharti, T. Tripathi, A. Mishra, O.P. Sidhu, R. Roy, C.S. Nautiyal, Metabolic profiling of *Commiphora wightii* (guggul) reveals a potential source for pharmaceuticals and nutraceuticals, *Phytochemistry.* 110 (2015) 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.016>.
- [333] R.M. Ikeda, W.L. Stanley, S.H. Vannier, E.M. Spitler, The Monoterpene Hydrocarbon Composition of Some Essential Oils, *J. Food Sci.* 27 (1962) 455–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1962.tb00126.x>.
- [334] K. Asres, A. Tei, G. Moges, F. Sporer, M. Wink, Terpenoid Composition of the Wound-Induced Bark Exudate of *Commiphora tenuis* from Ethiopia, *Planta Med.* 64 (1998) 473–475. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957489>.
- [335] Saxena VK, Sharma RN, Constituents of the essential oil from *Commiphora mukul* gum resin., *J Med Arom Plant Sci.* 20 (1998) 55–56.
- [336] H. Hashim EL-Kamali, Determination of Volatile Compounds from *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. Resin Marketed in Central Sudan by GC/MS, *Am. J. Biosci.* 3 (2015) 117. <https://doi.org/10.11648/j.ajbio.20150304.11>.
- [337] T.T. Tole, L. Abayneh, CHEMICAL STUDIES OF COMMIPHORATEREBINTHINA AND PYCNOSTACHYS ABYSSINICA OCCURRING IN ETHIOPIA, (2020) 22.
- [338] Y.O.H. Assad, B. Torto, A. Hassanali, P.G.N. Njagi, N.H.H. Bashir, H. Mahamat, Seasonal variation in the essential oil composition of *Commiphora quadricincta* and its effect on the maturation of immature adults of the desert locust, *Schistocerca gregaria*, *Phytochemistry.* 44 (1997) 833–841. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00559-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00559-6).
- [339] J.T. Sheehama, C. Mukakalisa, T. Amakali, L.N. Uusiku, R.H. Hans, K. Nott, A. Nott, S. Louw, Chemical characterization and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Commiphora wildii* Merxm. (omumbiri) resin, *Flavour Fragr. J.* 34 (2019) 241–251. <https://doi.org/10.1002/ffj.3495>.
- [340] M. Gebrehiwot, K. Asres, D. Bisrat, A. Mazumder, P. Lindemann, F. Bucar, Evaluation of the

- wound healing property of *Commiphora guidottii* Chiov. ex. Guid., BMC Complement. Altern. Med. 15 (2015) 282. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0813-2>.
- [341] S.K. Yeo, A.Y. Ali, O.A. Hayward, D. Turnham, T. Jackson, I.D. Bowen, R. Clarkson, β -Bisabolene, a Sesquiterpene from the Essential Oil Extract of Opoponax (*Commiphora guidottii*), Exhibits Cytotoxicity in Breast Cancer Cell Lines: ANTI-TUMOUR PROPERTIES OF β -BISABOLENE, Phytother. Res. 30 (2016) 418–425. <https://doi.org/10.1002/ptr.5543>.
- [342] Mincione, Enrico; Iavarone, Carlo, Terpenes of the *Commiphora myrra*. I, Chim. E Ind. Milan Italy. (1972) Pages424-5.
- [343] S.R. Ahamad, A.R. Al-Ghadeer, R. Ali, W. Qamar, S. Aljarboa, Analysis of inorganic and organic constituents of myrrh resin by GC–MS and ICP-MS: An emphasis on medicinal assets, Saudi Pharm. J. 25 (2017) 788–794. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.10.011>.
- [344] Z. Jemmali, A. Chartier, C. Elfakir, Development of a gas chromatography–mass spectrometry method to monitor in a single run, mono- to triterpenoid compounds distribution in resinous plant materials, J. Chromatogr. A. 1443 (2016) 241–253. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.031>.
- [345] L.O.A. Manguro, I. Ugi, P. Lemmen, Further Bisabolenes and Dammarane Triterpenes of *Commiphora* kua Resin, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 51 (2003) 479–482. <https://doi.org/10.1248/cpb.51.479>.
- [346] D. Fraternali, S. Sosa, D. Ricci, S. Genovese, F. Messina, S. Tomasini, F. Montanari, M.C. Marcotullio, Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal furanosesquiterpenoids isolated from *Commiphora erythraea* (Ehrenb.) Engl. resin, Fitoterapia. 82 (2011) 654–661. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.02.002>.
- [347] V.V. Ebani, F. Bertelloni, B. Najjar, S. Nardoni, L. Pistelli, F. Mancianti, Antimicrobial Activity of Essential Oils against Staphylococcus and Malassezia Strains Isolated from Canine Dermatitis, Microorganisms. 8 (2020) 252. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020252>.
- [348] Hosseinkhani, A., Ghavidel, F., Mohagheghzadeh, A., Zarshenas, M., Analysis of six populations of *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. oleo-gum resin, Trends Pharm. Sci. 3 (2017) 7–12.
- [349] M. Mahboubi, L. Mohammad Taghizadeh Kashani, The anti-dermatophyte activity of *Commiphora molmol*, Pharm. Biol. 54 (2016) 720–725. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1072831>.
- [350] A. Craveiro, S. Corsano, G. Proietti, G. Strappaghetti, Constituents of Essential Oil of *Commiphora guidottii*, Planta Med. 48 (1983) 97–98. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969896>.
- [351] N.S. Younis, M.E. Mohamed, Protective effects of myrrh essential oil on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats through antioxidant, anti-inflammatory, Nrf2/HO-1 and apoptotic pathways, J. Ethnopharmacol. 270 (2021) 113793. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113793>.
- [352] E.J. Muturi, W.T. Hay, K.M. Doll, J.L. Ramirez, G. Selling, Insecticidal Activity of *Commiphora erythraea* Essential Oil and Its Emulsions Against Larvae of Three Mosquito Species, J. Med. Entomol. 57 (2020) 1835–1842. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa097>.
- [353] T.T. Tole, E. Diriba, L.A. Bahiru, Bioactive compounds from *Croton macrostachyus* and *Commiphora habessinica* occurring in Ethiopia, Adv. Tradit. Med. (2021). <https://doi.org/10.1007/s13596-021-00570-x>.

- [354] T.T. Tole, L. Abayneh, Chemical studies of *Commiphora terebinthina* and *Pycnostachys abyssinica* occurring in Ethiopia, (2020) 22.
- [355] L.O. Hanuš, D. Rosenthal, T. Řezanka, V.M. Dembitsky, A. Moussaief, Fast and easy GC/MS identification of myrrh resins, *Pharm. Chem. J.* 42 (2008) 719–720. <https://doi.org/10.1007/s11094-009-0209-z>.
- [356] V.N. Madia, M. De Angelis, D. De Vita, A. Messori, A. De Leo, D. Ialongo, V. Tudino, F. Saccoliti, G. De Chiara, S. Garzoli, L. Scipione, A.T. Palamara, R. Di Santo, L. Nencioni, R. Costi, Investigation of *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. Oil and Its Main Components for Antiviral Activity, *Pharmaceuticals*. 14 (2021) 243. <https://doi.org/10.3390/ph14030243>.
- [357] N.A.A. Ali, M. Wurster, N. Arnold, L. Wessjohan, Essential Oil Composition from Oleogum Resin of *Commiphora kua*, *Rec Nat Prod.* (2008) 7.
- [358] X. Ma, X. Yu, Z. Zheng, J. Mao, Analytical supercritical fluid extraction of Chinese herbal medicines, *Chromatographia*. 32 (1991) 40–44. <https://doi.org/10.1007/BF02262464>.
- [359] N.M. Ammar, S.S. El-Hawary, A.A. Mahdy, R.A. Hussein, Phytochemical Study of the Biologically Active Fractions of the Oleo-gum-resins of *Boswellia carteri* and *Commiphora myrrha*, *Adv. Environ. Biol.* (2013) 2573–2583.
- [360] M.A. Birkett, S.A. Abassi, T. Kröber, K. Chamberlain, A.M. Hooper, P.M. Guerin, J. Pettersson, J.A. Pickett, R. Slade, L.J. Wadhams, Antiectoparasitic activity of the gum resin, gum haggarr, from the East African plant, *Commiphora holtziana*, *Phytochemistry*. 69 (2008) 1710–1715. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.017>.
- [361] K. Perveen, N.A. Bokhari, I. Siddique, S.A.I. Al-Rashid, Antifungal Activity of Essential Oil of *Commiphora molmol* Oleo Gum Resin, *J. Essent. Oil Bear. Plants*. 21 (2018) 667–673. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1492975>.
- [362] N. Khalil, S. Fikry, O. Salama, Bactericidal activity of Myrrh extracts and two dosage forms against standard bacterial strains and multidrug-resistant clinical isolates with GC/MS profiling, *AMB Express*. 10 (2020) 21. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-0958-3>.
- [363] M.M. Rahman, M. Garvey, L.J.V. Piddock, S. Gibbons, Antibacterial terpenes from the oleo-resin of *Commiphora molmol* (Engl.), *Phytother. Res.* 22 (2008) 1356–1360. <https://doi.org/10.1002/ptr.2501>.
- [364] N.A.A. Ali, M. Wurster, U. Lindequist, Chemical Composition of Essential oil from the Oleogum Resin of *Commiphora habessinica* (Berg.) Engl. from Yemen, *J. Essent. Oil Bear. Plants*. 12 (2009) 244–249. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643717>.
- [365] L. Lebanov, L. Tedone, A. Ghiasvand, B. Paull, Random Forests machine learning applied to gas chromatography – Mass spectrometry derived average mass spectrum data sets for classification and characterisation of essential oils, *Talanta*. 208 (2020) 120471. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120471>.
- [366] Chiteva, R., Yenesew, A., Chikamai, B., Wanjohi, J., PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF RESINS FROM KENYAN *Commiphora holtziana*, *Int. J. Curr. Res.* 5 (2013) 1791–1793.
- [367] H.L. Greve, M. Kaiser, T.J. Schmidt, Investigation of Antiplasmodial Effects of Terpenoid

- Compounds Isolated from Myrrh, *Planta Med.* 86 (2020) 643–654. <https://doi.org/10.1055/a-1157-9463>.
- [368] W. Dinku, S.U. Choi, S.-H. Lee, Y.-S. Jung, A. Dekebo, Chemical constituents Anti-proliferative activity of resin of *C. sphaerocarpa* against four human cancer cell lines, *Ethiop. J. Sci. Sustain. Dev.* (2020) 21-28 Pages. <https://doi.org/10.20372/EJSSDASTU:V7.I2.2020.194>.
- [369] N. Dudai, A. Shachter, P. Satyal, W. Setzer, Chemical Composition and Monoterpenoid Enantiomeric Distribution of the Essential Oils from *Apharsemon* (*Commiphora gileadensis*), *Medicines*. 4 (2017) 66. <https://doi.org/10.3390/medicines4030066>.
- [370] M. Andersson, O. Bergendorff, R. Shan, P. Zygmunt, O. Sterner, Minor Components with Smooth Muscle Relaxing Properties from Scented Myrrh (*Commiphora guidotti*), *Planta Med.* 63 (1997) 251–254. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957665>.
- [371] I.C. Nigam, L. Levi, Essential oils and their constituents, *J. Chromatogr. A.* 23 (1966) 217–226. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)98676-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)98676-5).
- [372] N. Zhao, G.-C. Yang, D.-H. Li, X.-Y. Li, Z.-L. Li, J. Bai, X.-Q. Liu, H.-M. Hua, Two New Sesquiterpenes from Myrrh, *Helv. Chim. Acta.* 98 (2015) 1332–1336. <https://doi.org/10.1002/hlca.201500094>.
- [373] Q. Zhou, Y. Liu, Y. Tang, Y. Shokoohinia, A.G. Chittiboyina, M. Wang, C. Avonto, Identification of Potential Skin Sensitizers in Myrrh, *Cosmetics*. 6 (2019) 47. <https://doi.org/10.3390/cosmetics6030047>.
- [374] T. Shen, W.-Z. Wan, X.-N. Wang, L.-M. Sun, H.-Q. Yuan, X.-L. Wang, M. Ji, H.-X. Lou, Sesquiterpenoids from the Resinous Exudates of *Commiphora opobalsamum* (Burseraceae), *Helv. Chim. Acta.* 91 (2008) 881–887. <https://doi.org/10.1002/hlca.200890092>.
- [375] T. Shen, W.-Z. Wan, X.-N. Wang, H.-Q. Yuan, M. Ji, H.-X. Lou, A Triterpenoid and Sesquiterpenoids from the Resinous Exudates of *Commiphora myrrha*, *Helv. Chim. Acta.* 92 (2009) 645–652. <https://doi.org/10.1002/hlca.200800347>.
- [376] K. Kuck, G. Jürgenliemk, B. Lipowicz, J. Heilmann, Sesquiterpenes from Myrrh and Their ICAM-1 Inhibitory Activity In Vitro, *Molecules*. 26 (2020) 42. <https://doi.org/10.3390/molecules26010042>.
- [377] S.-S. Zhu, D.-P. Qin, S.-X. Wang, C. Yang, G.-P. Li, Y.-X. Cheng, Commipholactam A, a cytotoxic sesquiterpenoidal lactam from Resina *Commiphora*, *Fitoterapia*. 134 (2019) 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.03.008>.
- [378] J. Xu, Y. Guo, P. Zhao, P. Guo, Y. Ma, C. Xie, D. Jin, L. Gui, Four new sesquiterpenes from *Commiphora myrrha* and their neuroprotective effects, *Fitoterapia*. 83 (2012) 801–805. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.03.016>.
- [379] J. Xu, Y. Guo, Y. Li, P. Zhao, C. Liu, Y. Ma, J. Gao, W. Hou, T. Zhang, Sesquiterpenoids from the Resinous Exudates of *Commiphora myrrha* and Their Neuroprotective Effects, *Planta Med.* 77 (2011) 2023–2028. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280087>.
- [380] C.-Y. Ge, J.-L. Zhang, Bioactive sesquiterpenoids and steroids from the resinous exudates of *Commiphora myrrha*, *Nat. Prod. Res.* 33 (2019) 309–315. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1448811>.

- [381] B.-Y. Hu, D.-P. Qin, S.-X. Wang, J.-J. Qi, Y.-X. Cheng, Novel Terpenoids with Potent Cytotoxic Activities from Resina Commiphora, *Molecules*. 23 (2018) 3239. <https://doi.org/10.3390/molecules23123239>.
- [382] Y.-F. Yu, Y.-H. Liu, X.-H. Chen, D.-J. Zhi, F.-M. Qi, Z.-P. Zhang, Y.-Q. Li, Z.-X. Zhang, D.-Q. Fei, Cadinane-type sesquiterpenes from the resinous exudates of *Commiphora myrrha* and their anti-Alzheimer's disease bioactivities, *Fitoterapia*. 142 (2020) 104536. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104536>.
- [383] J.-L. Yang, Y.-P. Shi, Cycloartane-type triterpenoids and sesquiterpenoids from the resinous exudates of *Commiphora opobalsamum*, *Phytochemistry*. 76 (2012) 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.01.004>.
- [384] X. Yang, D. Wang, Y. Yan, Y. Jiao, Y. Cheng, F. Wang, Commiphoranes K–O, New Terpenoids from Resina Commiphora and Their Anti-Inflammatory Activities, *Chem. Biodivers.* (2021) cbdv.202100265. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100265>.
- [385] J. Xu, Y. Guo, P. Zhao, C. Xie, D. Jin, W. Hou, T. Zhang, Neuroprotective cadinane sesquiterpenes from the resinous exudates of *Commiphora myrrha*, *Fitoterapia*. 82 (2011) 1198–1201. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.08.001>.
- [386] S.M. Al-Massarany, F.A. Abbas, B. Demirci, K.H.C. Baser, S.I. Khan, A.J. Al-Rehaily, J.S. Mossa, E.A. Abourashed, Chemical Composition and Biological Evaluation of the Essential Oil of *Commiphora opobalsamum* L., *J. Herbs Spices Med. Plants*. 13 (2008) 111–121. <https://doi.org/10.1080/10496470801946133>.
- [387] P. Claeson, R. Andersson, G. Samuelsson, T-Cadinol: A Pharmacologically Active Constituent of Scented Myrrh: Introductory Pharmacological Characterization and High Field ¹H- and ¹³C-NMR Data, *Planta Med.* 57 (1991) 352–356. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960116>.
- [388] A. Dekebo, E. Dagne, L.K. Hansen, O.R. Gautun, A.J. Aasen, Two octanordammarane triterpenes from *Commiphora kua*, *Phytochemistry*. 59 (2002) 399–403. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00413-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00413-7).
- [389] N. Zhu, S. Sheng, S. Sang, R.T. Rosen, C.-T. Ho, Isolation and characterization of several aromatic sesquiterpenes from *Commiphora myrrha*, *Flavour Fragr. J.* 18 (2003) 282–285. <https://doi.org/10.1002/ffj.1193>.
- [390] F. Ahmed, M. Ali, O. Singh, New Compounds from *Commiphora myrrha* (Nees) Engl., *ChemInform*. 37 (2006). <https://doi.org/10.1002/chin.200652186>.
- [391] A. Asif, M.A. Saeed, Cytotoxic effect of some furanosesquiterpenes from balsamodendron myrrha nees. oleo-gum-resin on brine shrimp (*artemia salina*) larvae ayesha asif1, *ACTA Pharm. Sci.* 58 (2020) 433. <https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS.05824>.
- [392] C.-Z. Zhu, B.-Y. Hu, J.-W. Liu, Y. Cai, X.-C. Chen, D.-P. Qin, Y.-X. Cheng, Z.-D. Zhang, Anti-Mycobacterium tuberculosis Terpenoids from Resina Commiphora, *Molecules*. 24 (2019) 1475. <https://doi.org/10.3390/molecules24081475>.
- [393] T. Shen, W. Wan, H. Yuan, F. Kong, H. Guo, P. Fan, H. Lou, Secondary metabolites from *Commiphora opobalsamum* and their antiproliferative effect on human prostate cancer cells, *Phytochemistry*. 68 (2007) 1331–1337. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.013>.

- [394] E. Santoro, F. Messina, M.C. Marcotullio, S. Superchi, Absolute configuration of bioactive furanogermacrenones from *Commiphora erythraea* (Ehrenb) Engl. by computational analysis of their chiroptical properties, *Tetrahedron*. 70 (2014) 8033–8039. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.08.038>.
- [395] E. Cenci, F. Messina, E. Rossi, F. Epifano, M.C. Marcotullio, Antiviral Furanosesquiterpenes from *Commiphora erythraea*, *Nat. Prod. Commun.* 7 (2012) 1934578X1200700. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200700201>.
- [396] T. Shen, G.-H. Li, Q.-Q. Zhong, S.-Q. Wang, D.-M. Ren, H.-X. Lou, X.-N. Wang, Myrrhanolide D and Myrrhasin A, New Germacrane-Type Sesquiterpenoids from the Resin of *Commiphora opobalsamum*, *Helv. Chim. Acta.* 97 (2014) 881–886. <https://doi.org/10.1002/hlca.201300328>.
- [397] S. Santoro, S. Superchi, F. Messina, E. Santoro, O. Rosati, C. Santi, M.C. Marcotullio, Agarsenone, a Cadinane Sesquiterpenoid from *Commiphora erythraea*, *J. Nat. Prod.* 76 (2013) 1254–1259. <https://doi.org/10.1021/np400114b>.
- [398] S.-E.N. Ayyad, T.R. Hoye, W.M. Alarif, S.M. Al Ahmadi, S.A. Basaif, M.A. Ghandourah, F.A. Badria, Differential cytotoxic activity of the petroleum ether extract and its furanosesquiterpenoid constituents from *Commiphora molmol* resin, *Z. Für Naturforschung C.* 70 (2015) 87–92. <https://doi.org/10.1515/znc-2014-4191>.
- [399] A. Dekebo, E. Dagne, O. Sterner, Furanosesquiterpenes from *Commiphora sphaerocarpa* and related adulterants of true myrrh, *Fitoterapia.* 73 (2002) 48–55. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00367-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00367-7).
- [400] P. Dolara, B. Corte, C. Ghelardini, A. Pugliese, E. Cerbai, S. Menichetti, A. Lo Nostro, Local Anaesthetic, Antibacterial and Antifungal Properties of Sesquiterpenes from Myrrh, *Planta Med.* 66 (2000) 356–358. <https://doi.org/10.1055/s-2000-8532>.
- [401] G.J. Provan, A.I. Gray, P.G. Waterman, Sesquiterpenes from the myrrh-type resins of some kenyan *Commiphora* species, *Flavour Fragr. J.* 2 (1987) 109–113. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730020306>.
- [402] C. Brieskorn, P. Noble, Inhaltsstoffe des etherischen Öls der Myrrhe, *Planta Med.* 44 (1982) 87–90. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971408>.
- [403] Mincione, Enrico; Iavarone, Carlo, Terpenes of the *Commiphora myrra*. II, *Chim. E Ind. Milan Italy.* (1972) Pages525-7.
- [404] L. Dong, Q. Luo, L.-Z. Cheng, Y.-M. Yan, Y.-X. Cheng, S.-M. Wang, New terpenoids from *Resina Commiphora*, *Fitoterapia.* 117 (2017) 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.01.013>.
- [405] N. Zhu, H. Kikuzaki, S. Sheng, S. Sang, M.M. Rafi, M. Wang, N. Nakatani, R.S. DiPaola, R.T. Rosen, C.-T. Ho, Furanosesquiterpenoids of *Commiphora myrrha*, *J. Nat. Prod.* 64 (2001) 1460–1462. <https://doi.org/10.1021/np010072j>.
- [406] S.-S. Zhu, J.-W. Liu, Y.-M. Yan, Y. Liu, Z. Mao, Y.-X. Cheng, Terpenoids from *Resina Commiphora* Regulating Lipid Metabolism via Activating PPAR α and CPT1 Expression, *Org. Lett.* 22 (2020) 3428–3432. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c00898>.
- [407] L. Dong, L.-Z. Cheng, Y.-M. Yan, S.-M. Wang, Y.-X. Cheng, Commiphoranes A–D, Carbon Skeletal Terpenoids from *Resina Commiphora*, *Org. Lett.* 19 (2017) 286–289.

<https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b03661>.

- [408] H. Hashim EL-Kamali, Determination of Volatile Compounds from *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. Resin Marketed in Central Sudan by GC/MS, *Am. J. Biosci.* 3 (2015) 117. <https://doi.org/10.11648/j.ajbio.20150304.11>.
- [409] X. Zhao, X. Yuan, S. Chen, L. Meng, D. Fu, Role of the tomato TAGL1 gene in regulating fruit metabolites elucidated using RNA sequence and metabolomics analyses, *PLOS ONE.* 13 (2018) e0199083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199083>.
- [410] S.-L. Su, J.-A. Duan, Y.-P. Tang, X. Zhang, L. Yu, F.-R. Jiang, W. Zhou, D. Luo, A.-W. Ding, Isolation and Biological Activities of Neomyrrhaol and Other Terpenes from the Resin of *Commiphora myrrha*, *Planta Med.* 75 (2009) 351–355. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1112214>.
- [411] L.O.A. Manguro, S.A. Opiyo, E. Herdtweck, P. Lemmen, Triterpenes of *Commiphora holtziana* oleo-gum resin, *Can. J. Chem.* 87 (2009) 1173–1179. <https://doi.org/10.1139/V09-078>.
- [412] JI Kai, KONG Feng, SHEN Tao, WANG Xiaoling, XU Aihui, YUAN Huiqing, ZHANG Xiutian, Separation and identification of myrrh sesquiterpenoids and their anti-proliferation effect on tumor cells, *Acta Acad. Med. Shandong.* issue 4 (2008) 344–348.
- [413] X. Miao, L. Zheng, Z. Zhao, S. Su, Y. Zhu, J. Guo, E. Shang, D. Qian, J. Duan, Protective Effect and Mechanism of Boswellic Acid and Myrrha Sesquiterpenes with Different Proportions of Compatibility on Neuroinflammation by LPS-Induced BV2 Cells Combined with Network Pharmacology, *Molecules.* 24 (2019) 3946. <https://doi.org/10.3390/molecules24213946>.
- [414] A. S. Alqahtani, F.A. Nasr, O.M. Noman, M. Farooq, T. Alhawassi, W. Qamar, A. El-Gamal, Cytotoxic Evaluation and Anti-Angiogenic Effects of Two Furano-Sesquiterpenoids from *Commiphora myrrh* Resin, *Molecules.* 25 (2020) 1318. <https://doi.org/10.3390/molecules25061318>.
- [415] R. Ubillas, C. Mendez, S. Jolad, J. Luo, S. King, T. Carlson, D. Fort, Antihyperglycemic Furanosquiterpenes from *Commiphora myrrha*, *Planta Med.* 65 (1999) 778–779. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960870>.
- [416] A. S. Alqahtani, F.A. Nasr, O.M. Noman, M. Farooq, T. Alhawassi, W. Qamar, A. El-Gamal, Cytotoxic Evaluation and Anti-Angiogenic Effects of Two Furano-Sesquiterpenoids from *Commiphora myrrh* Resin, *Molecules.* 25 (2020) 1318. <https://doi.org/10.3390/molecules25061318>.
- [417] I.S. Cavanagh, M.D. Cole, I.S. Cavanagh, S. Gibbons, A.I. Gray, G.J. Provan, P.G. Waterman, A novel sesquiterpene, 1,2-epoxyfuran-10(15)-germacren-6-one, from the resin of *Commiphora holtziana* Engl., *Flavour Fragr. J.* 8 (1993) 39–41. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730080108>.
- [418] S. Bao, C. Li, H. Li, J. Wang, J. Luan, Y. Zhang, L. Chen, Y. Hu, X. Wang, Myrrh terpenes A and B, anti-inflammatory cadinane sesquiterpenes from the resin of *Commiphora myrrha*, *Phytochem. Lett.* 44 (2021) 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.06.024>.
- [419] A. Dekebo, E. Dagne, L.K. Hansen, O.R. Gautun, A.J. Aasen, Crystal structures of two furanosquiterpenes from *Commiphora sphaerocarpa*, *Tetrahedron Lett.* 41 (2000) 9875–9878. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)01752-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)01752-4).
- [420] K.H.C. Ba?er, B. Demirci, A. Dekebo, E. Dagne, Essential oils of some *Boswellia* spp., Myrrh and *Opopanax*, *Flavour Fragr. J.* 18 (2003) 153–156. <https://doi.org/10.1002/ffj.1166>.

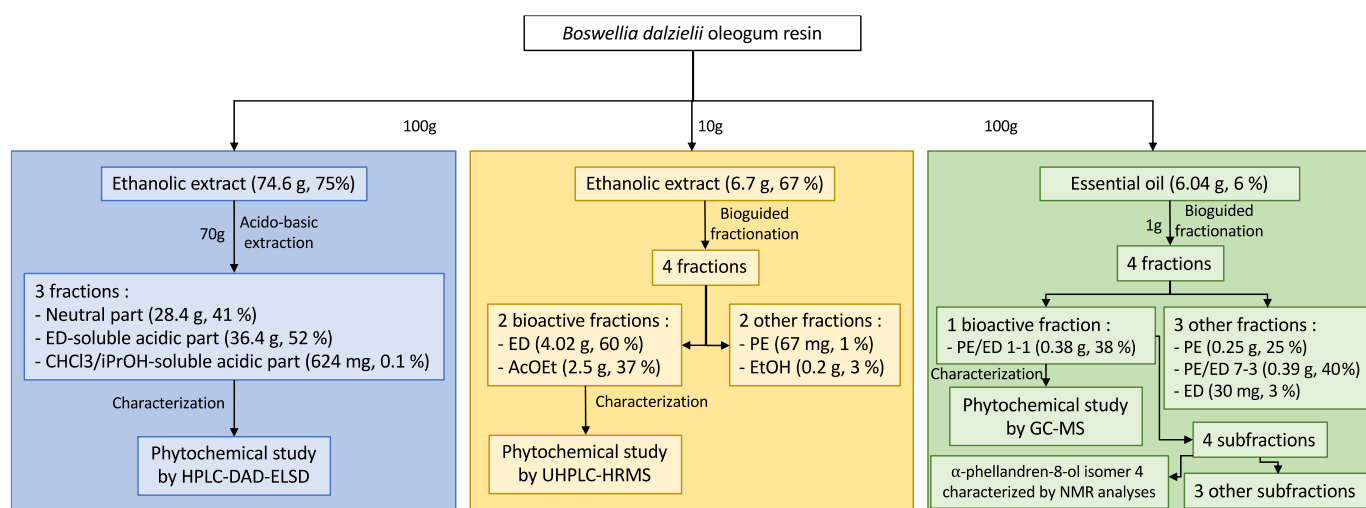
- [421] Program of Applied Chemistry, Adama Science and Technology University, Ethiopia, A. Dekebo, Antiproliferative Effect of Sterols from Resin of *Commiphora habessinica*, J. Pharm. Nutr. Sci. 9 (2019) 71–80. <https://doi.org/10.29169/1927-5951.2019.09.02.3>.
- [422] S. Bai, M. Jain, ¹H and ¹³C assignments of five cembrenes from guggul, Magn. Reson. Chem. 46 (2008) 791–793. <https://doi.org/10.1002/mrc.2252>.
- [423] G. Ruecker, ChemInform Abstract: Ueber monocyclische diterpene aus dem indischen gugal-Harz (*Commiphora mukul*), Chem. Informationsdienst. 3 (1972) no-no. <https://doi.org/10.1002/chin.197241168>.
- [424] H. Matsuda, T. Morikawa, S. Ando, H. Oominami, T. Murakami, I. Kimura, M. Yoshikawa, Absolute Stereostructures of Polypodane-Type Triterpenes, Myrrhanol A and Myrrhanone A, from Guggul-Gum Resin (the Resin of Balsamodendron mukul), Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 52 (2004) 1200–1203. <https://doi.org/10.1248/cpb.52.1200>.
- [425] H. Matsuda, T. Morikawa, S. Ando, H. Oominami, T. Murakami, I. Kimura, M. Yoshikawa, Absolute stereostructures of polypodane- and octanordammarane-type triterpenes with nitric oxide production inhibitory activity from guggul-gum resins, Bioorg. Med. Chem. 12 (2004) 3037–3046. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.020>.
- [426] W. Gao, X. Dong, N. Xie, C. Zhou, Y. Fan, G. Chen, Y. Wang, T. Wei, D. Zhu, Dehydroabietic Acid Isolated from *Commiphora opobalsamum* Causes Endothelium-Dependent Relaxation of Pulmonary Artery via PI3K/Akt-eNOS Signaling Pathway, Molecules. 19 (2014) 8503–8517. <https://doi.org/10.3390/molecules19068503>.
- [427] N.U. Rehman, H. Hussain, H.Y. Khan, R. Csuk, G. Abbas, I.R. Green, A. Al-Harrasi, A norterpenoid and tripenoids from *Commiphora mukul*: isolation and biological activity, Z. Für Naturforschung B. 72 (2017) 11–15. <https://doi.org/10.1515/znb-2016-0062>.
- [428] N.U. Rehman, S.A. Al-Riyami, H. Hussain, A. Ali, A.L. Khan, A. Al-Harrasi, Secondary metabolites from the resins of *Aloe vera* and *Commiphora mukul* mitigate lipid peroxidation, Acta Pharm. 69 (2019) 433–441. <https://doi.org/10.2478/acph-2019-0027>.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Composés terpéniques non volatils à intérêt médicinal : triterpénoïdes de <i>B. dalzielii</i>	150
ANNEXE 2: Composés terpéniques semi-volatils à intérêt médicinal : diterpènes de <i>B. papyrifera</i>	164
ANNEXE 3: Procédure expérimentale permettant l'obtention d'acides boswelliques.	176
ANNEXE 4: Étude des odorants de <i>B. sacra</i>	180
ANNEXE 5: Étude des composés volatils de <i>C. myrrha</i> , partiellement basée sur la revue en préparation	184
ANNEXE 6: Étude des odorants de <i>C. myrrha</i>	210
ANNEXE 7: Étude des odorants de <i>C. ladanifer</i>	216

ANNEXE 1 : Composés terpéniques non volatiles à intérêt médicinaux : triterpénoïdes de *B. dalzielii*Phytochemical study of *Boswellia dalzielii* oleo-gum resin and evaluation of its biological properties.

Kimberley Massei, Thomas Michel, Girma Ilayas Obersat, Ahmed Al-Harrasi, Nicolas Baldovini

1. Fractionation of essential oil and ethanolic extract of *B. dalzielii* resinFigure 1 : Fractionation scheme of essential oil and ethanolic extract of *B. dalzielii* resin

2. Optimization of extraction parameters

Two different techniques of extraction were tested in order to compare the global extraction yield for the same solvent. Soxhlet extraction and ethanolic maceration of crushed frankincense resin were performed during 5 hours, solvent ratio 1:10 (v/v).

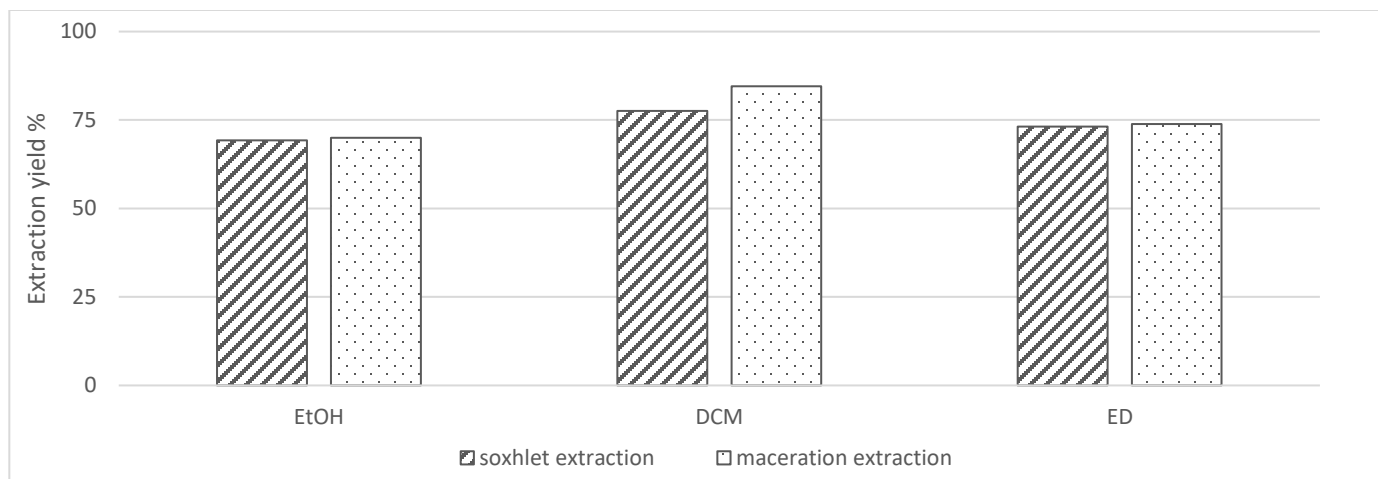


Figure 2 : Extraction yield for *Boswellia dalzielii*, after 5h Soxhlet or maceration extraction, using different solvents, ratio 1:10 (v/v).

3. Identification and Quantification of TPA in EtOH extract of *B. dalzielii* by UHPLC-Orbitrap

3.a. UHPLC-Orbitrap chromatogram of standards

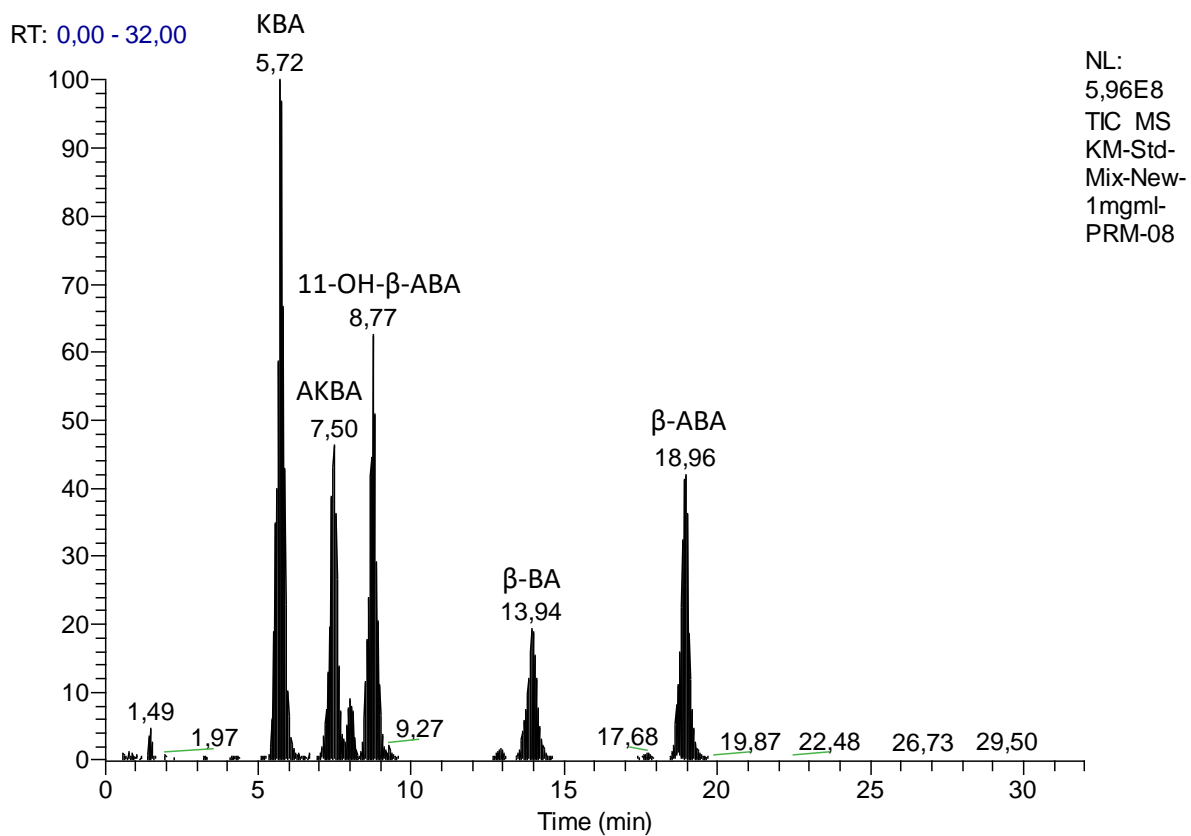


Figure 3 : UHPLC-Orbitrap Chromatogram of standards and their relative retention times, after MS/MS fragmentation, negative mode

ANNEXES

3.b. Mass spectra of compounds

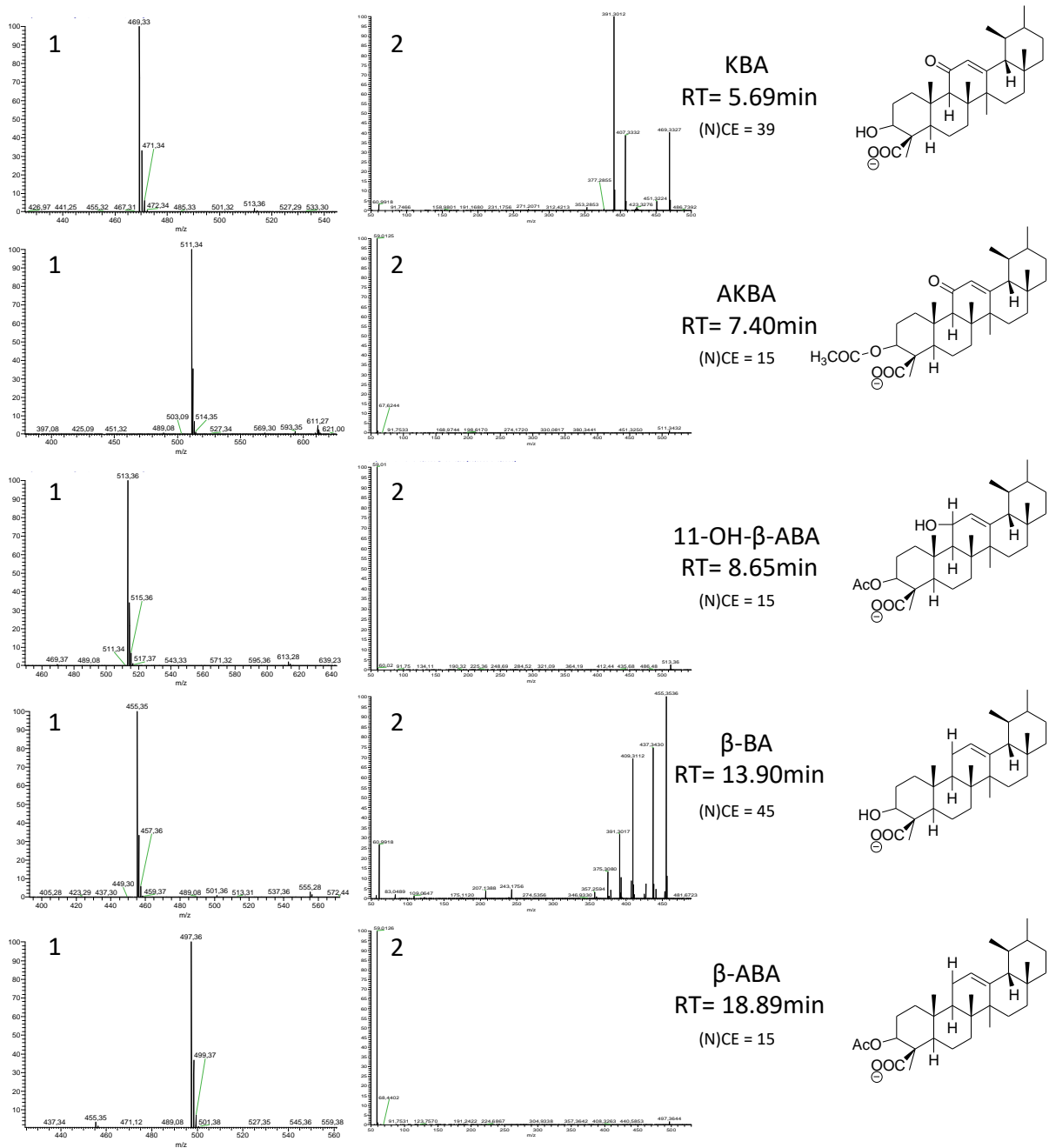


Figure 4 : Mass spectra of standard compounds. Mass spectra of every BA quantified, with their relative structure in negative ionization mode in MS (1), and mass spectra of compounds after MS/MS (2). Collision Energy N(CE) in eV.

3.c. UHPLC-Orbitrap chromatograms of EtOH extracts of *Boswellia* species, after MS/MS fragmentation

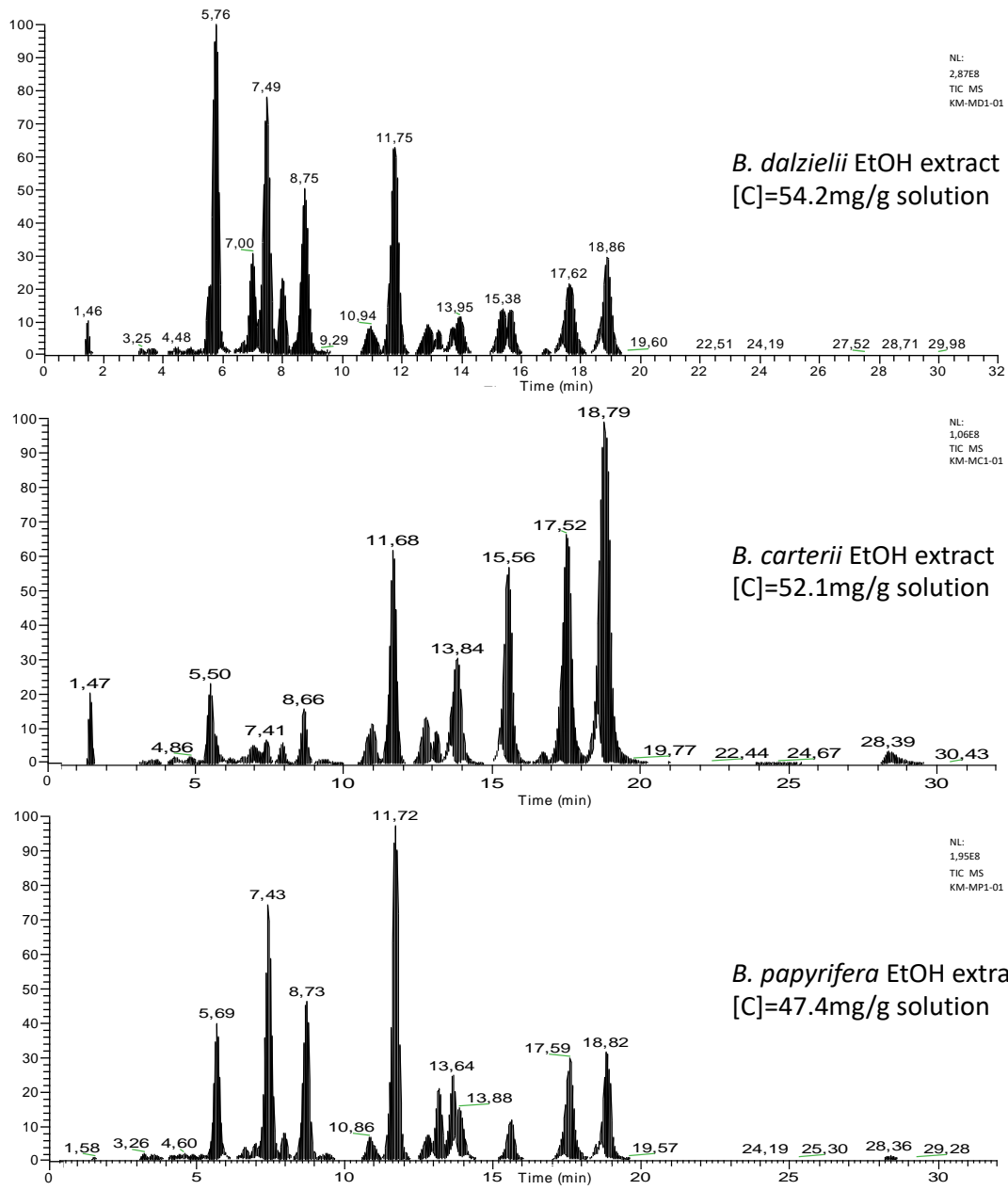


Figure 5 : UHPLC-Orbitrap Chromatograms of EtOH extracts of *Boswellia* species, after MS/MS fragmentation

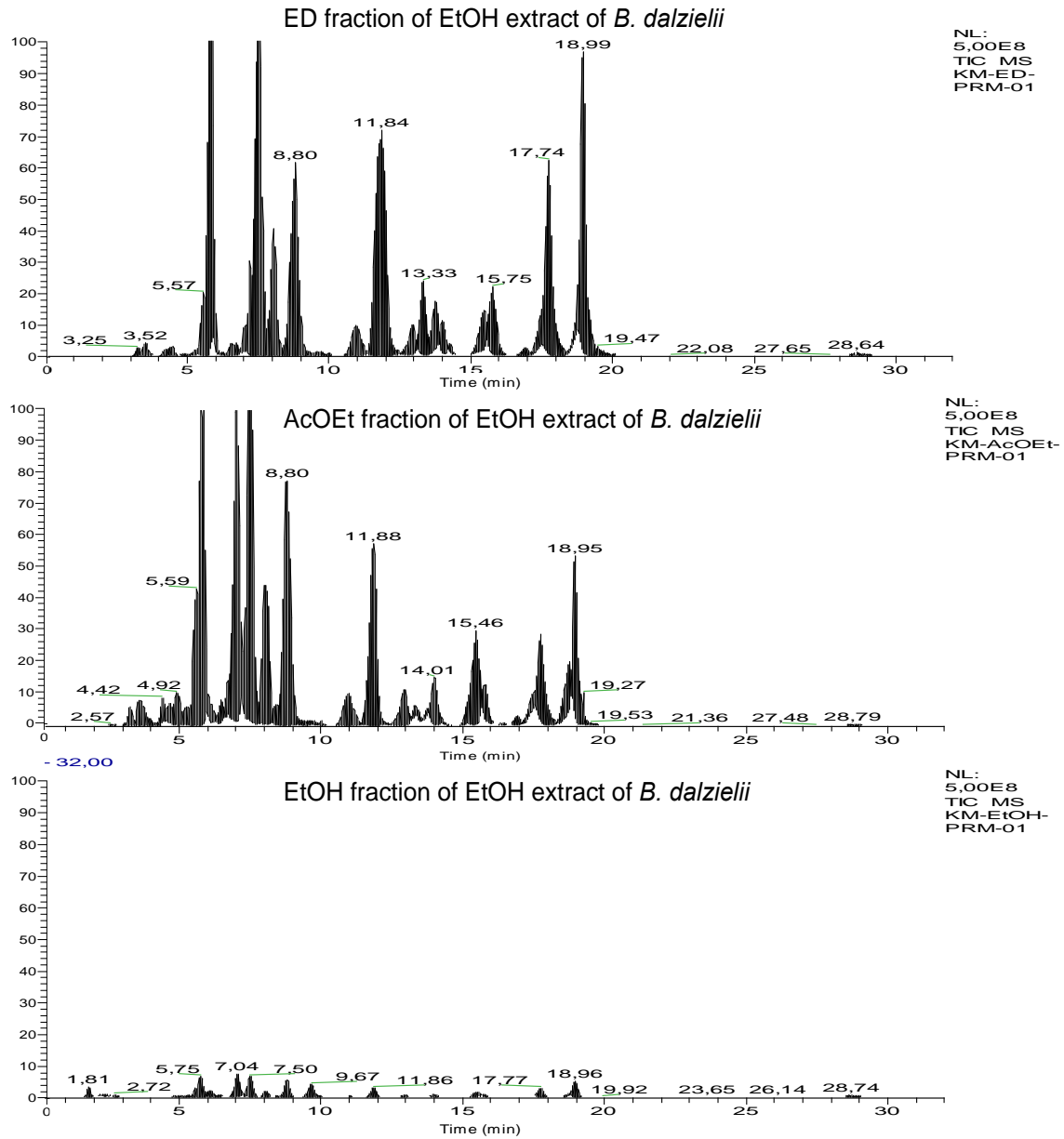
3.d. UHPLC-Orbitrap chromatograms of fractions from EtOH extract of *B. dalzielii*

Figure 6 : UHPLC-Orbitrap Chromatograms of fractions from EtOH extract, in negative ionization mode, after MS/MS fragmentation. Chromatograms are displayed with a same fixed scale, and comparable peak areas, between those three fractions.

3.e. UHPLC-Orbitrap chromatograms of EtOH extract, and MS spectra after MS/MS fragmentation of specific parent ions

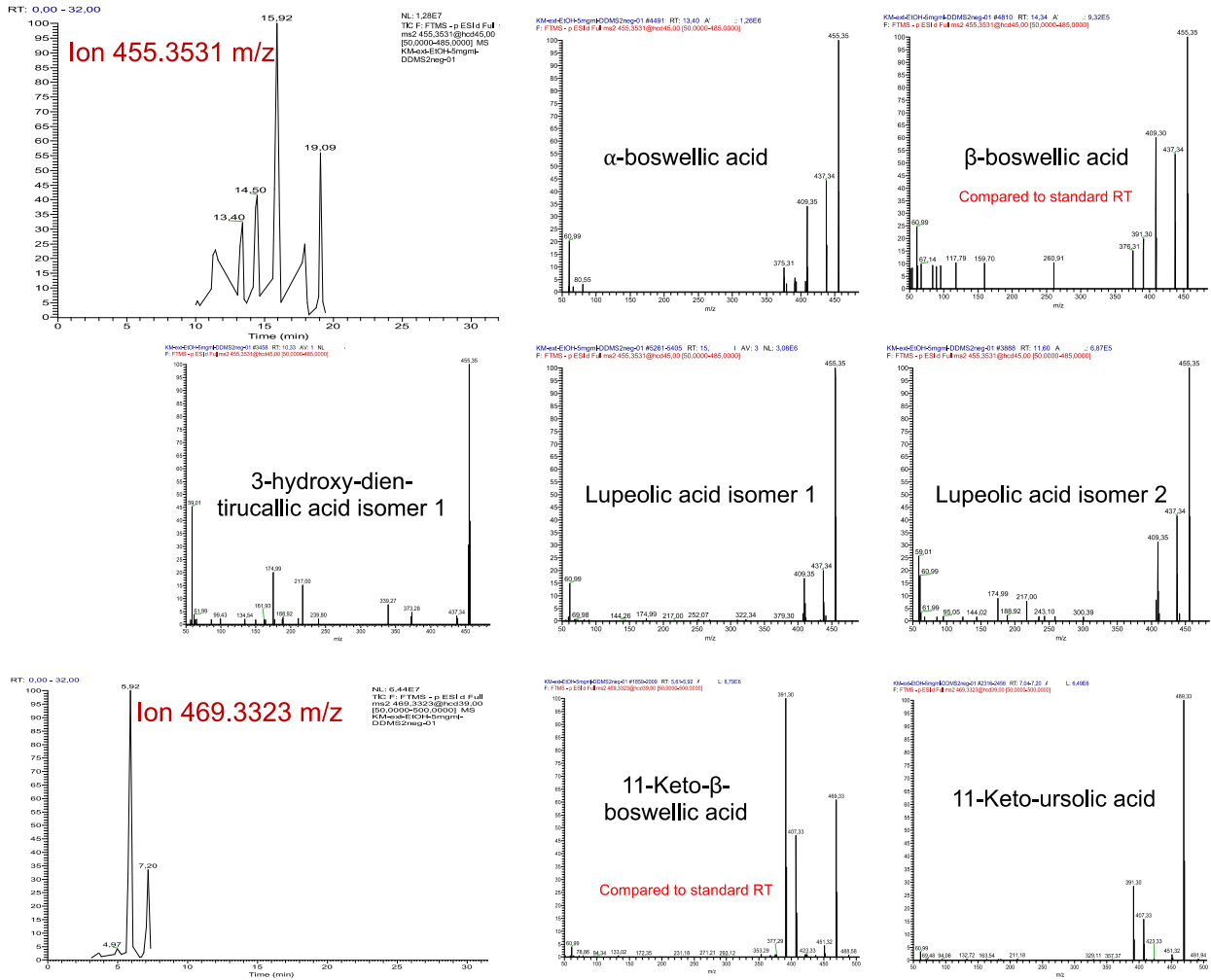


Figure 7 : UHPLC-Orbitrap Chromatograms of fractions from EtOH extract, in negative ionization mode in MS after MS/MS fragmentation of specific precursor ions (left), and MS spectra of precursor ions with their relative fragment ions (right). Identification based on RT of standards or/and mass spectra of compounds according to those published by Mannino et al.

Mannino, G.; Occhipinti, A.; Maffei, M. Quantitative Determination of 3-O-Acetyl-11-Keto-BBoswellic Acid (AKBA) and Other Boswellic Acids in *Boswellia Sacra* Flueck (Syn. *B. Carteri* Birdw) and *Boswellia Serrata* Roxb. *Molecules* 2016, 21, 1329, doi:10.3390/molecules21101329.

ANNEXES

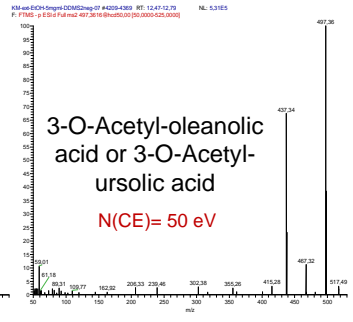
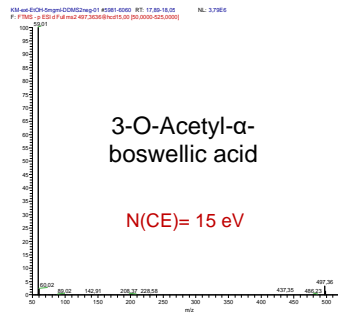
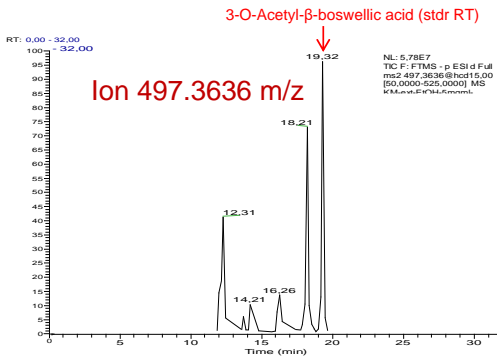
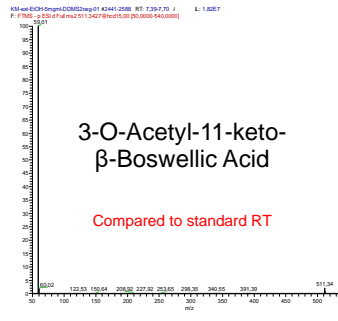
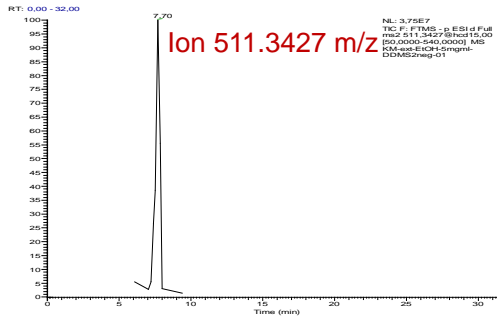


Figure 36 (continued) : UHPLC-Orbitrap Chromatograms of fractions from EtOH extract, in negative ionization mode in MS after MS/MS fragmentation of specific precursor ions (left), and MS spectra of precursor ions with their relative fragment ions (right). Identification based on RT of standards or/and mass spectra of compounds according to those published by Mannino et al.

Mannino, G.; Occhipinti, A.; Maffei, M. Quantitative Determination of 3-O-Acetyl-11-Keto-BBoswellic Acid (AKBA) and Other Boswellic Acids in *Boswellia Sacra* Flueck (Syn. *B. Carteri* Birdw) and *Boswellia Serrata* Roxb. *Molecules* 2016, 21, 1329, doi:10.3390/molecules21101329.

ANNEXES

3.f. Samples and standards concentrations calculations

Table 1 : Standard and samples amount spiked, final concentrations, quantification results, standard purity (%)

1) Standard concentrations spiked in samples

sample name	standard compound	mass of sample SAS1 mg	mass of SDS1 added mg	standard concentration mg/g
Dalzielii1	11OHABA	54,2	0	0
	AKBA	54,2	0	0
	KBA	54,2	0	0
	BABA	54,2	0	0
Dalzielii2	11OHABA	51	6,4	0,0999
	AKBA	51	6,4	0,0940
	KBA	51	6,4	0,0222
	BABA	51	6,4	0,0187
Dalzielii3	11OHABA	54,9	13,6	0,1779
	AKBA	54,9	13,6	0,1673
	KBA	54,9	13,6	0,0395
	BABA	54,9	13,6	0,0333
Dalzielii4	BABA	51,9	18,8	0,0446

sample name	standard compound	mass of sample SAS1 mg	mass of SDS1 added mg	standard concentration mg/g
Carterii1	11OHABA	52,1	0	0
	AKBA	52,1	0	0
	KBA	52,1	0	0
	BABA	52,1	0	0
Carterii2	11OHABA	48,8	7,1	0,1138
	AKBA	48,8	7,1	0,1071
	KBA	48,8	7,1	0,0252
	BABA	48,8	7,1	0,0213
Carterii3	11OHABA	53,9	10	0,1402
	AKBA	53,9	10	0,1319
	KBA	53,9	10	0,0311
Carterii4	AKBA	45,3	14	0,1045
	BABA	45,3	14	0,0729

sample name	standard compound	mass of sample SAS1 mg	mass of SDS2 added mg	standard concentration mg/g
Papyrifera1	11OHABA	47,4	0	0
	AKBA	47,4	0	0
	KBA	47,4	0	0
	BABA	47,4	0	0
Papyrifera2	11OHABA	49,6	4,5	0,0637
	AKBA	49,6	4,5	0,0368
	KBA	49,6	4,5	0,0080
	BABA	49,6	4,5	0,0257
Papyrifera3	11OHABA	53,4	10,6	0,1269
	AKBA	53,4	10,6	0,0733
	KBA	53,4	10,6	0,0159
	BABA	53,4	10,6	0,0512
Papyrifera4	BABA	47,1	16,9	0,0816

2) B-BA concentrations spiked in samples

sample name	mass of sample SAS2 mg	mass of B-BA standard added mg	initial standard concentration	standard concentration mg/g
BBA.dalzielii1	47,1	0	0	0
BBA.dalzielii2	58,8	9,8	0,0652	0,0093
BBA.dalzielii3	51,1	10,6	0,0652	0,0112
BBA.dalzielii4	45,8	15	0,0652	0,0161
BBA.carterii1	53,2	0	0	0,0000
BBA.carterii2	53,3	8	0,8698	0,1135
BBA.carterii3	52,4	17,2	0,8698	0,2150
BBA.carterii4	54,8	20,6	0,8698	0,2376
BBA.papyrifera1	55,4	0	0	0,0000
BBA.papyrifera2	43,1	7,4	0,1839	0,0270
BBA.papyrifera3	37	12,4	0,1839	0,0462

3) Samples and standards concentrations

species	SAS1 = sample solution1	
	concentration mg/g	concentration mg/g
<i>B. dalzielii</i>	0,5560	0,4774
<i>B. carterii</i>	0,3860	0,3224
<i>B. papyrifera</i>	0,3520	0,3206
compound	SDS1 = standard solution1	
	concentration mg/g	concentration mg/g
11-OH-ABA	0,8960	0,7662
AKBA	0,8429	0,4425
KBA	0,1987	0,0962
B-ABA	0,1676	0,3089

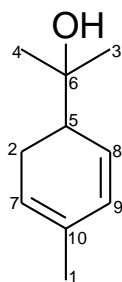
4) Quantification results for the three species

extract	Quantified compound	slope m	straight line intercept b	Cx mg/g solution corrected by standard purity	Cx g compound/g extract
<i>B. dalzielii</i>	11OHABA	2,05832E+11	1,11585E+11	0,0259	0,0466
	AKBA	1,21095E+11	1,56821E+11	0,0699	0,1258
	KBA	91309357921	1,66993E+11	0,0322	0,0579
	B-ABA	19220984626	76585524853	0,0441	0,0793
	B-BA	3852740924	11760986597	0,0040	0,0083
<i>B. carterii</i>	11OHABA	2,05915E+11	50661349582	0,0089	0,3287
	AKBA	1,03275E+11	38856757779	0,0154	0,7589
	KBA	65410169035	38264909043	0,0078	0,1256
	B-ABA	10579970826	1,20016E+11	0,0951	0,4073
	B-BA	40705694932	27792120772	0,0084	0,0261
<i>B. papyrifera</i>	11OHABA	1,61231E+11	63738355989	0,0166	0,1651
	AKBA	67694967947	89065884573	0,0383	0,2852
	KBA	58111890879	42082390184	0,0063	0,1446
	B-ABA	46951318442	46134184837	0,0206	1,7609
	B-BA	7087152377	24813951744	0,0177	0,0548

5) Standard purity %

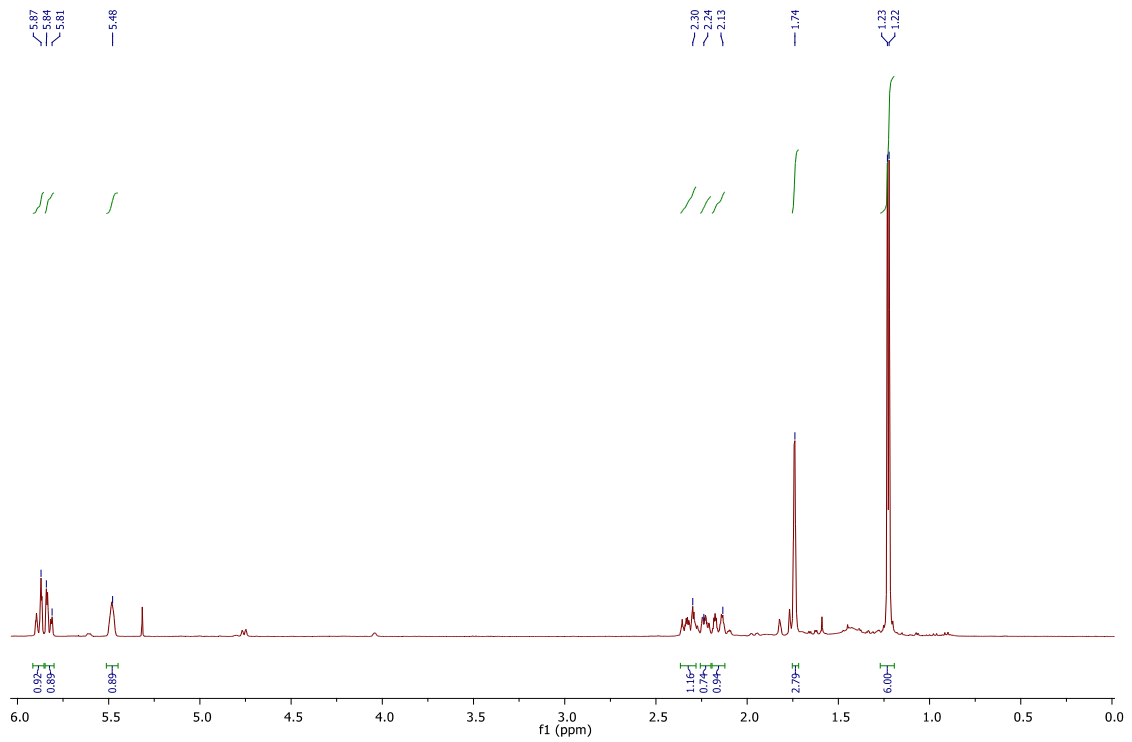
compound	Standard purity
11-OH-ABA	46%
AKBA	55%
KBA	77%
B-ABA	57%
B-BA	20%

3.g. NMR data and chart

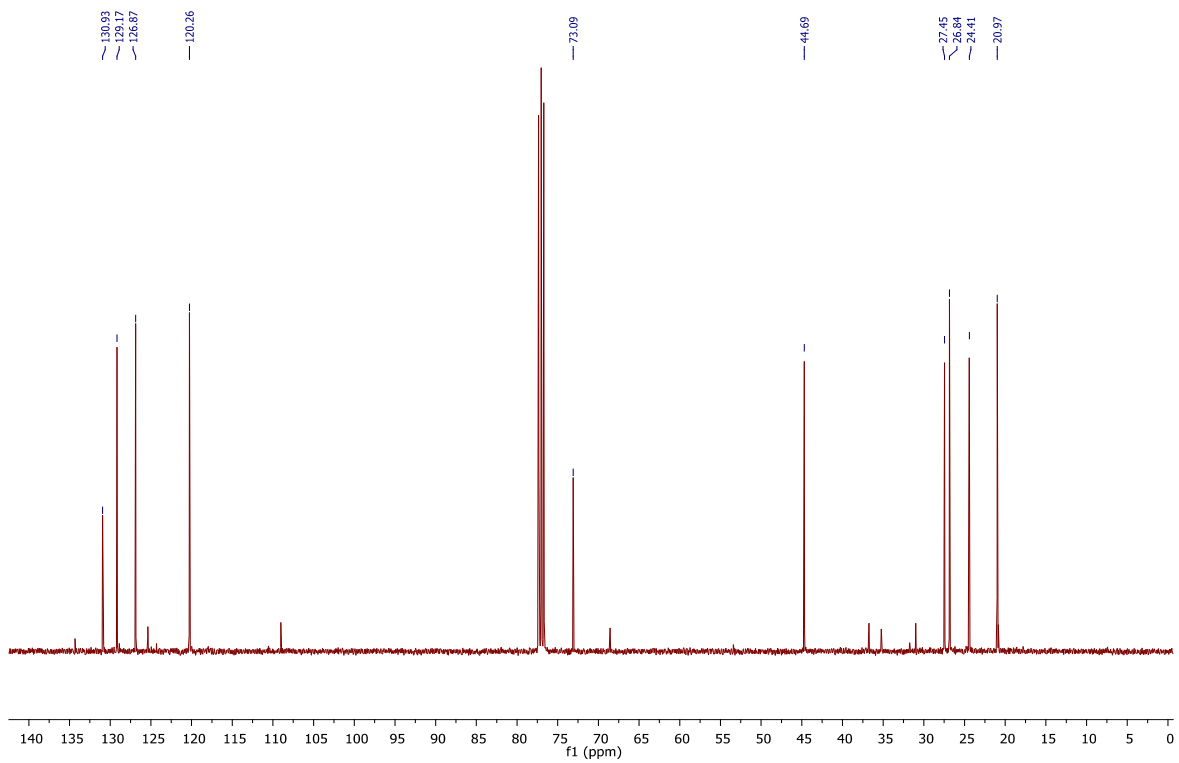
**Table 12** : ^1H and ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) data of α -phellandren-8-ol isomer 1 isolated from *B. dalzielii*.

Position	δ_{H}	mult, J (Hz)	δ_{C}
1	1.72, 1.72, 1.72	b.quad	20.97
2	2.13, 2.23	d.m, d.m	24.41
3	1.20, 1.20, 1.20	d	26.84
4	1.21, 1.21, 1.21	d	27.45
5	2.30	m	44.69
6	-	-	73.09
7	5.46	b.s. (m)	120.26
8	5.81	d.d., 2.8	126.87
9	5.85	d.t.	129.17
10	-	-	130.93

ANNEXES

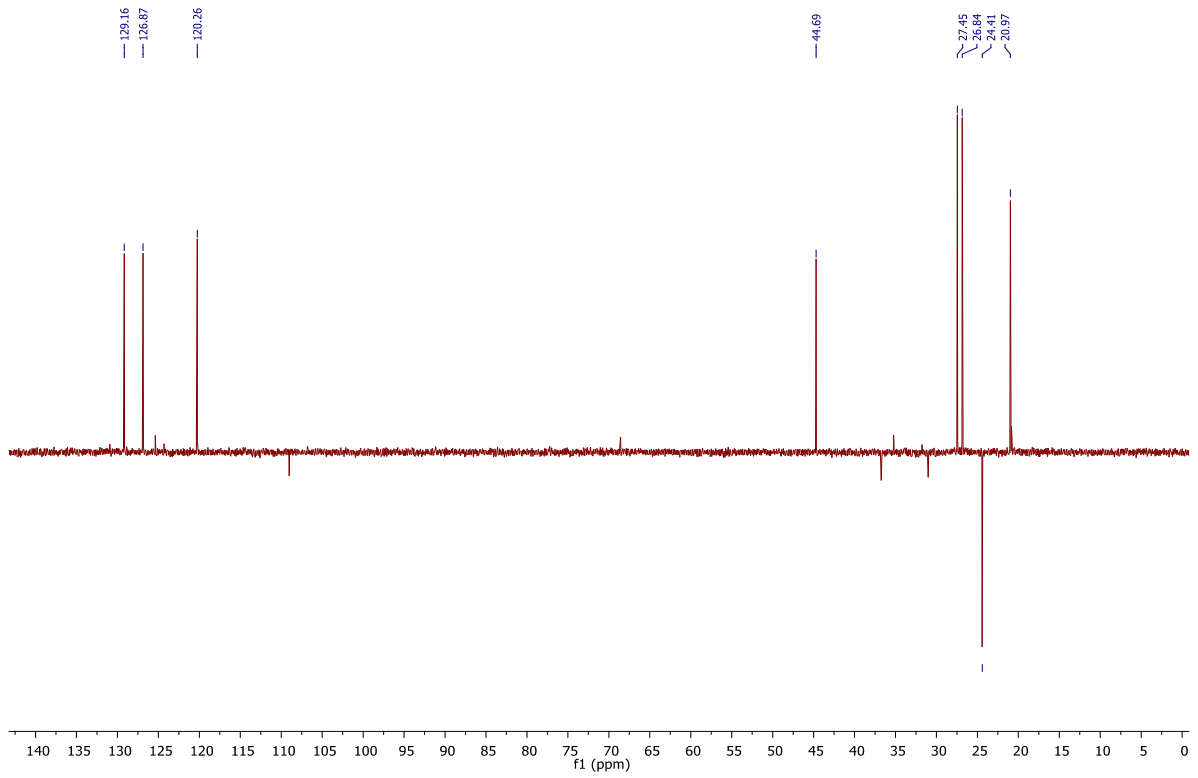


¹H NMR spectrum (400 MHz, CDCl₃) of α-phellandren-8-ol isomer 1 isolated from *B. dalzielii*.

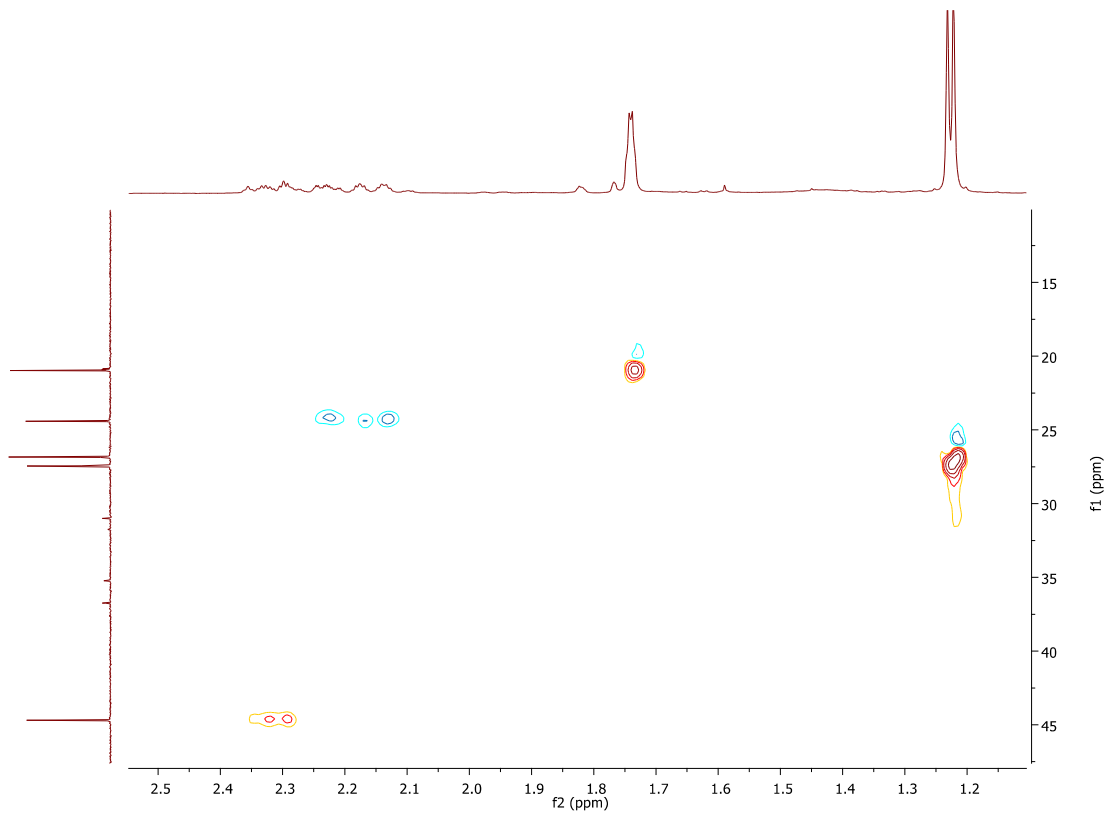


¹³C – DEPT135 NMR spectrum (400 MHz, CDCl₃) of α-phellandren-8-ol isomer 1 isolated from *B. dalzielii*.

ANNEXES

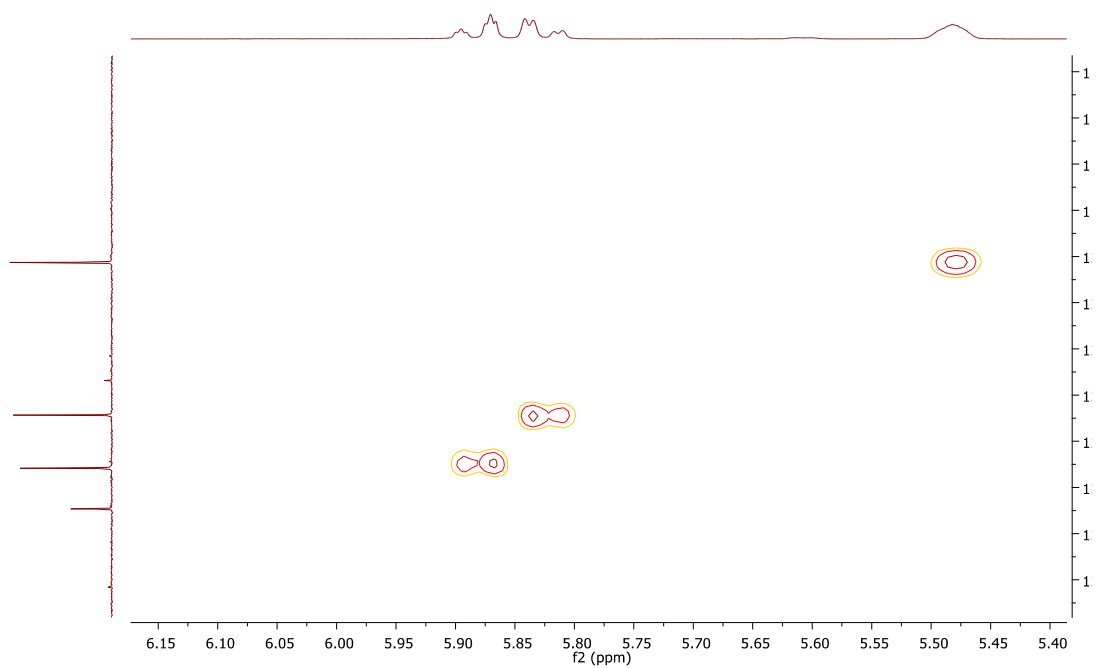


^{13}C - CPD NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) of α -phellandren-8-ol isomer 1 isolated from *B. dalzielii*.

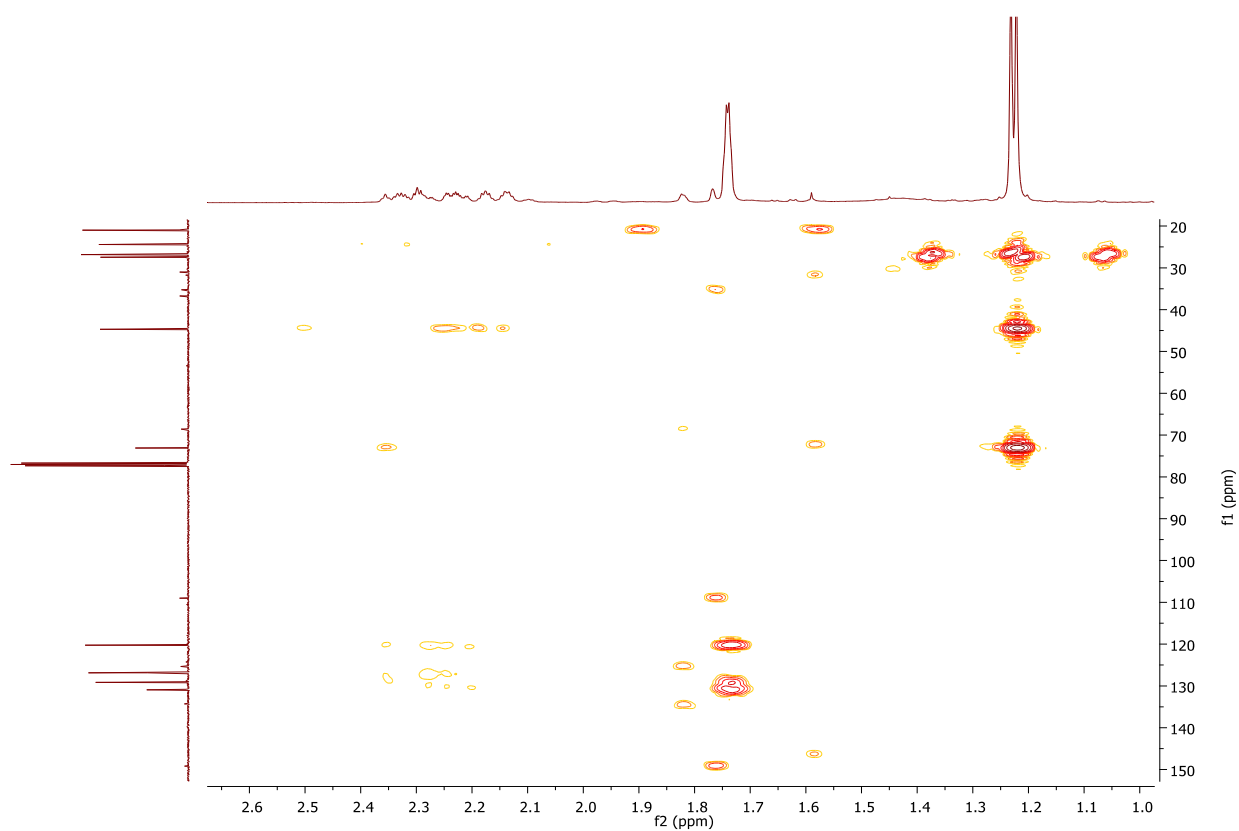


^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) of α -phellandren-8-ol isomer 1 isolated from *B. dalzielii*.

ANNEXES

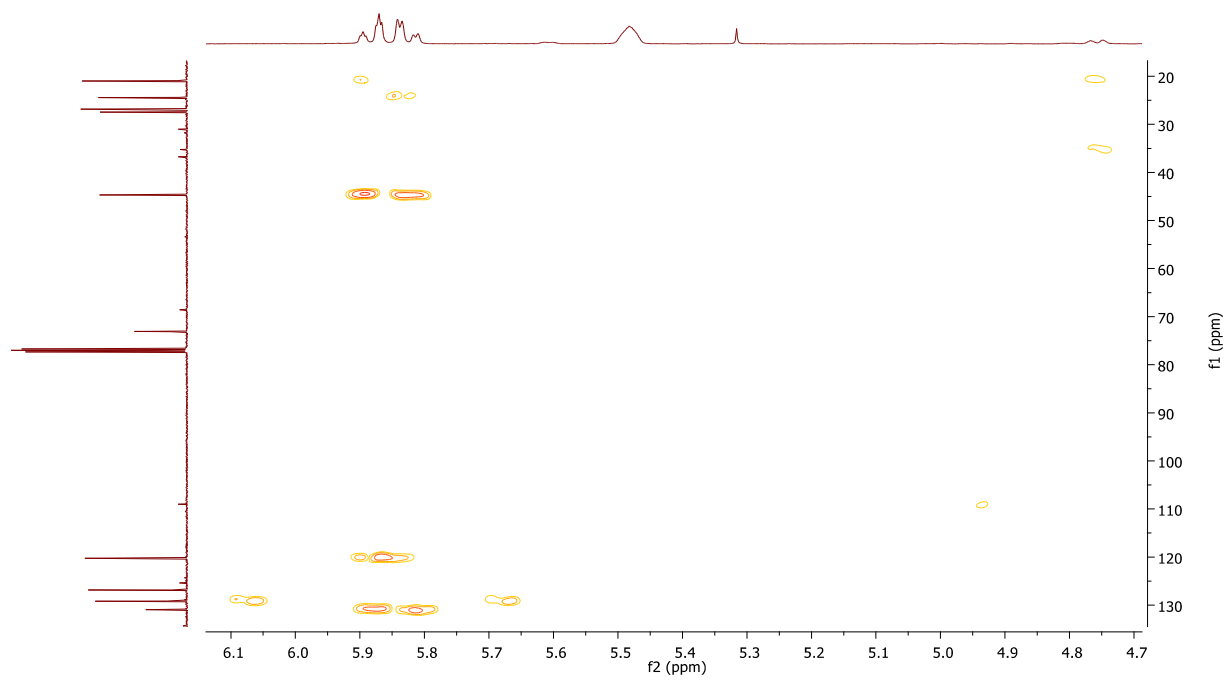


$^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) of α -phellandren-8-ol isomer 1 isolated from *B. dalzielii*.



$^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) of α -phellandren-8-ol isomer 1 isolated from *B. dalzielii*.

ANNEXES



^1H - ^{13}C HMBC NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) of α -phellandren-8-ol isomer 1 isolated from *B. dalzielii*.

ANNEXE 2: Composés terpéniques semi-volatils à intérêt médical : diterpènes de *B. papyrifera*

Cembrane diterpenes from *Boswellia papyrifera*

Kimberley Massei, Nicolas Baldovini

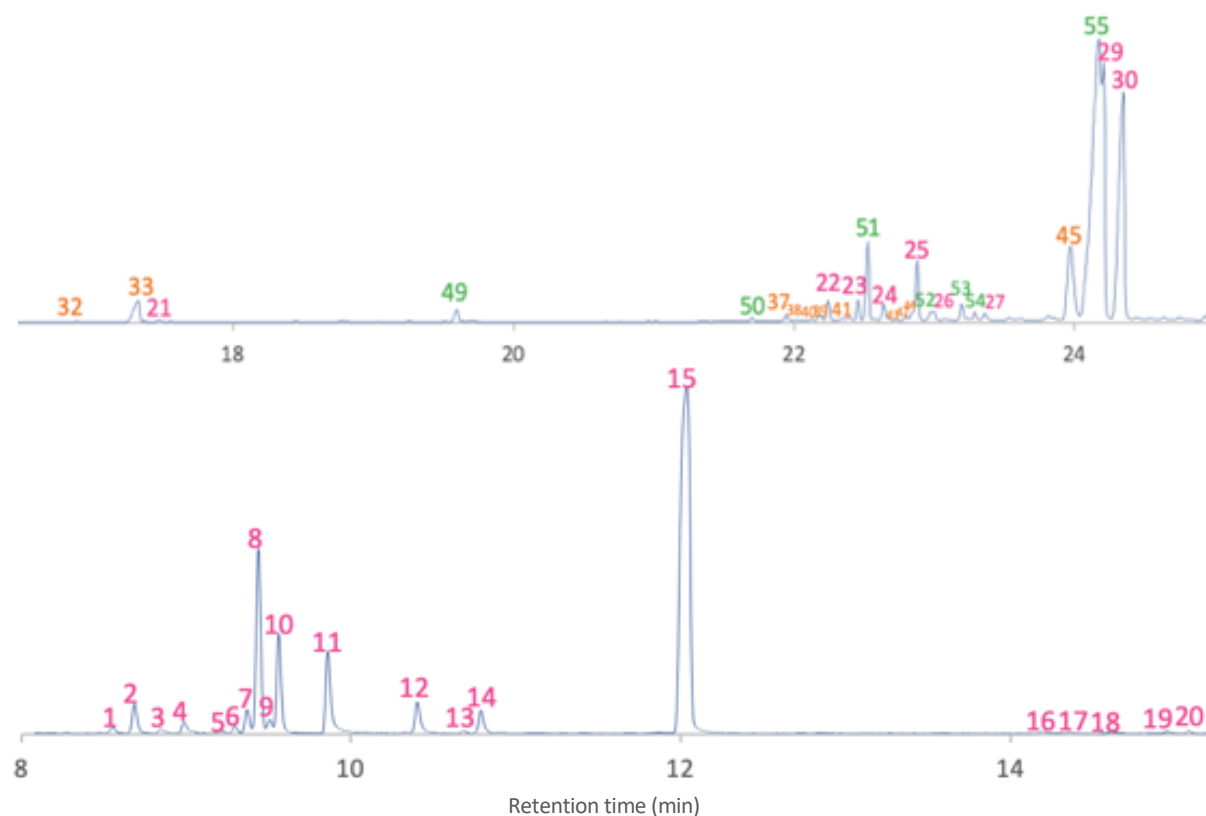


Figure 1 : Zooms on GC-MS chromatograms of compounds found in the first fraction (top), and in the 33rd fraction (bottom) obtained from the essential oil of *B. papyrifera*. Compounds numbers in pink were found in the oil from the very first fraction. Compounds numbers in orange were found in the oil after the first fraction obtained and before fraction 32. Compounds numbers in green were found in the oil after fraction 15. Compounds numbers are the same as reported in Figure 1.

ANNEXES

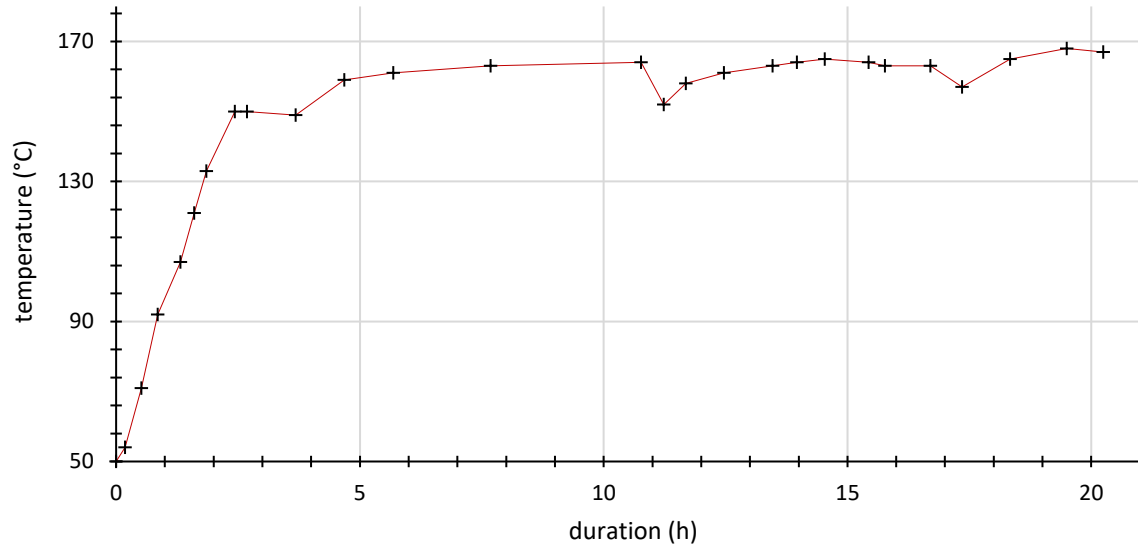


Figure 2: Evolution of the heating temperature of *B. papyrifera* extract as a function of time during kugelrohr distillation.

ANNEXES

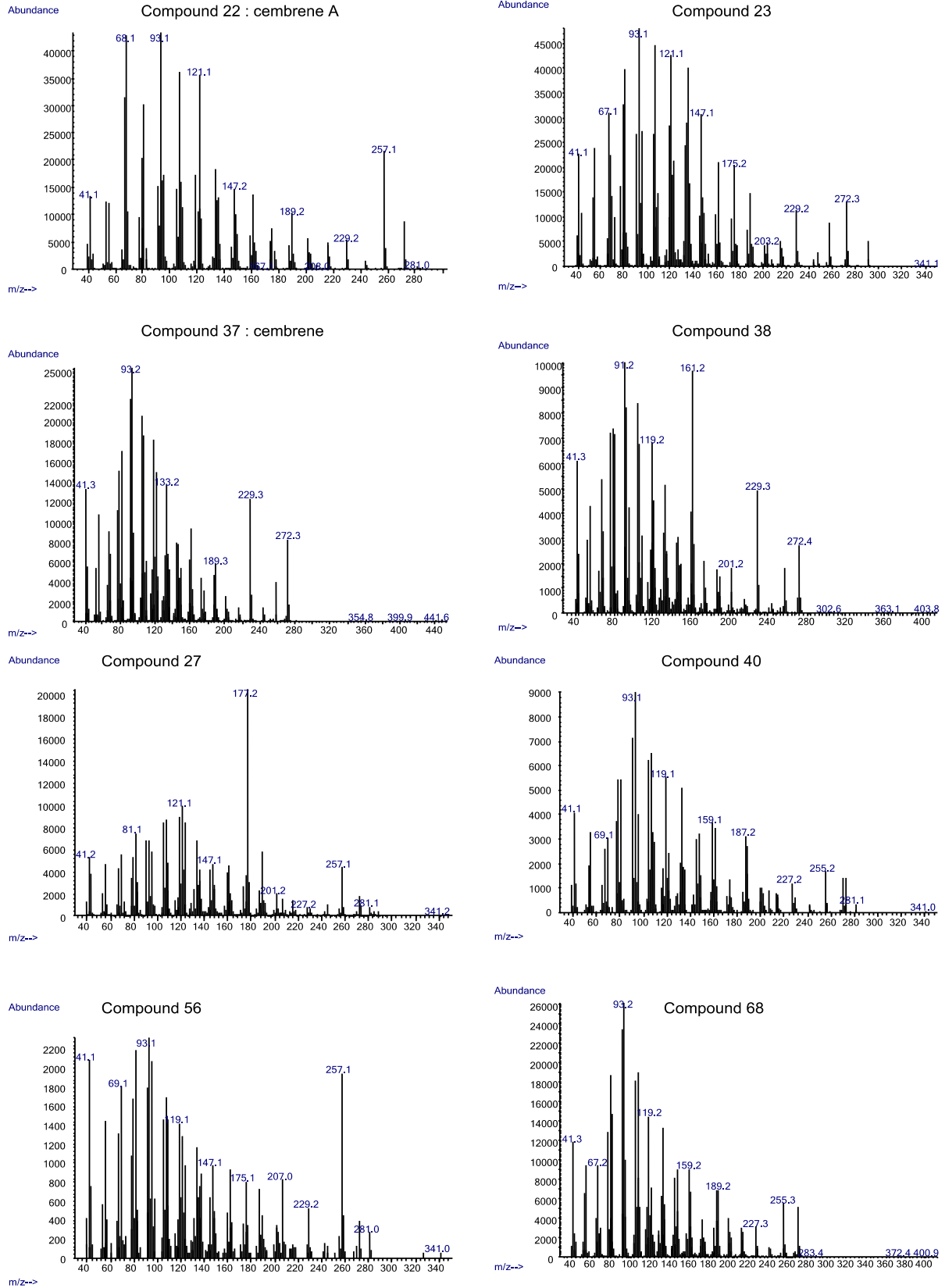
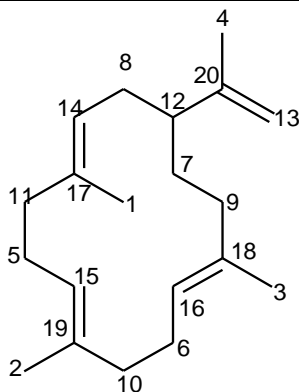


Figure 3 : Mass spectra of compounds from *B. papyrifera* distillate. Fragmentation: 70 eV.

ANNEXES

Table 1 : NMR data of Cembrene A, and its structure with corresponding attributions.

C	^{13}C δ (ppm)	multiplicity	^1H δ (ppm) by HSQC	COSY ^1H - ^1H	HMBC $\text{H} \rightarrow \text{C}$
1	15.5	CH ₃	1.51	-	9, 11
2	15.8	CH ₃	1.50	-	10, 1
3	18.22	CH ₃	1.49	4.98, 5.12	9
4	19.54	CH ₃	1.59	-	8, (9), 12, 1
5	24	CH ₂	2.02	-	-
			2.08	-	-
6	25.1	CH ₂	2.11	-	-
			2.19	-	-
7	28.5	CH ₂	1.30	-	-
			1.60	4.57	-
8	32.7	CH ₂	1.91	5.12	7, 15
			1.85	-	7, 12
9	34.2	CH ₂	1.7	-	7
			1.8	-	-
10	39.2	CH ₂	2.04	4.98	11, 16
			2.08	-	-
11	39.6	CH ₂	1.98	-	-
			1.99	-	14
12	46.2	CH	1.96	-	5, 7
13	110.3	CH ₂	4.57	1.6	4, 12
			4.63	-	4, 12
14	122.1	CH	4.98	1.49, 2.04	-
15	124.3	CH	5.12	1.49, 1.91	1
16	126.1	CH	4.9	-	-
17	133.7	C	-	-	-
18	134.2	C	-	-	-
19	135	C	-	-	-
20	149.5	C	-	-	-



ANNEXES

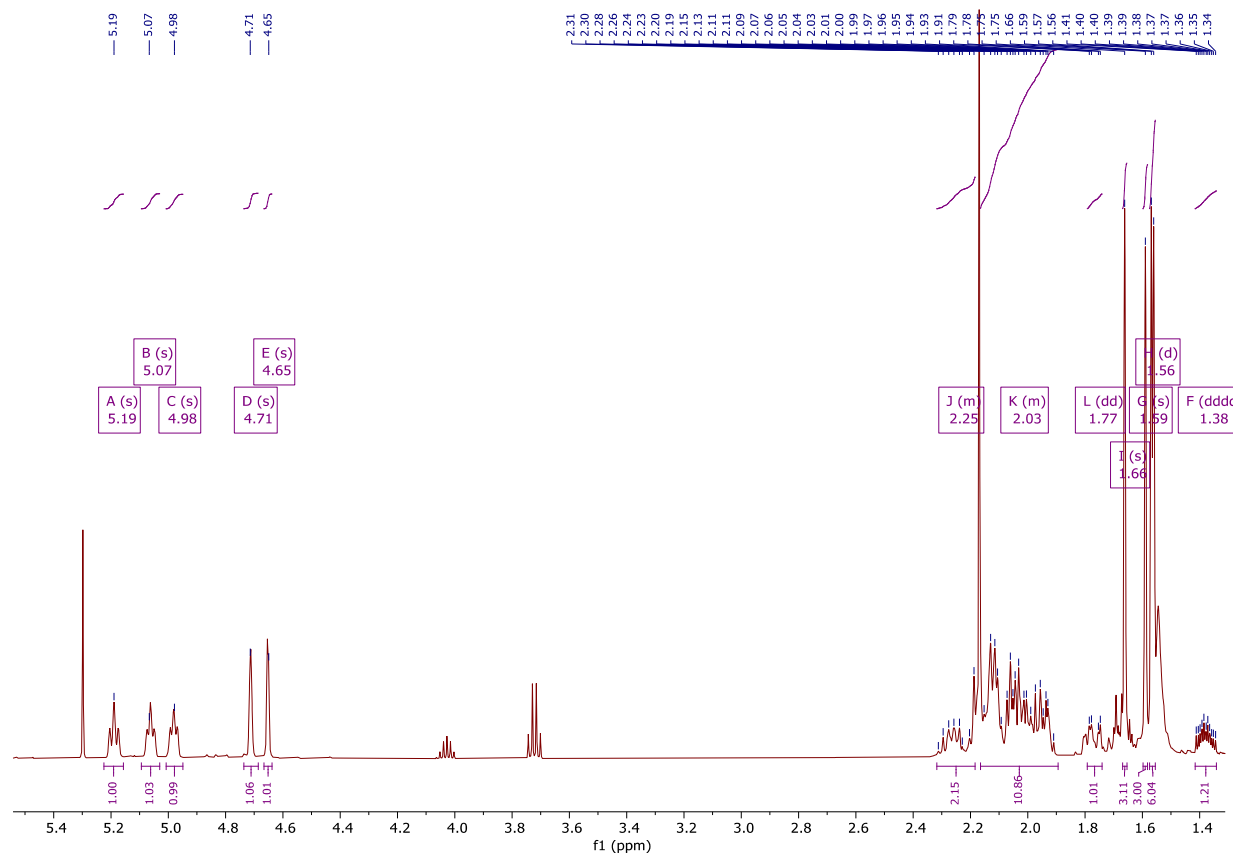


Figure 4: ^1H NMR spectrum of Cembrene A, 400 MHz, CDCl_3

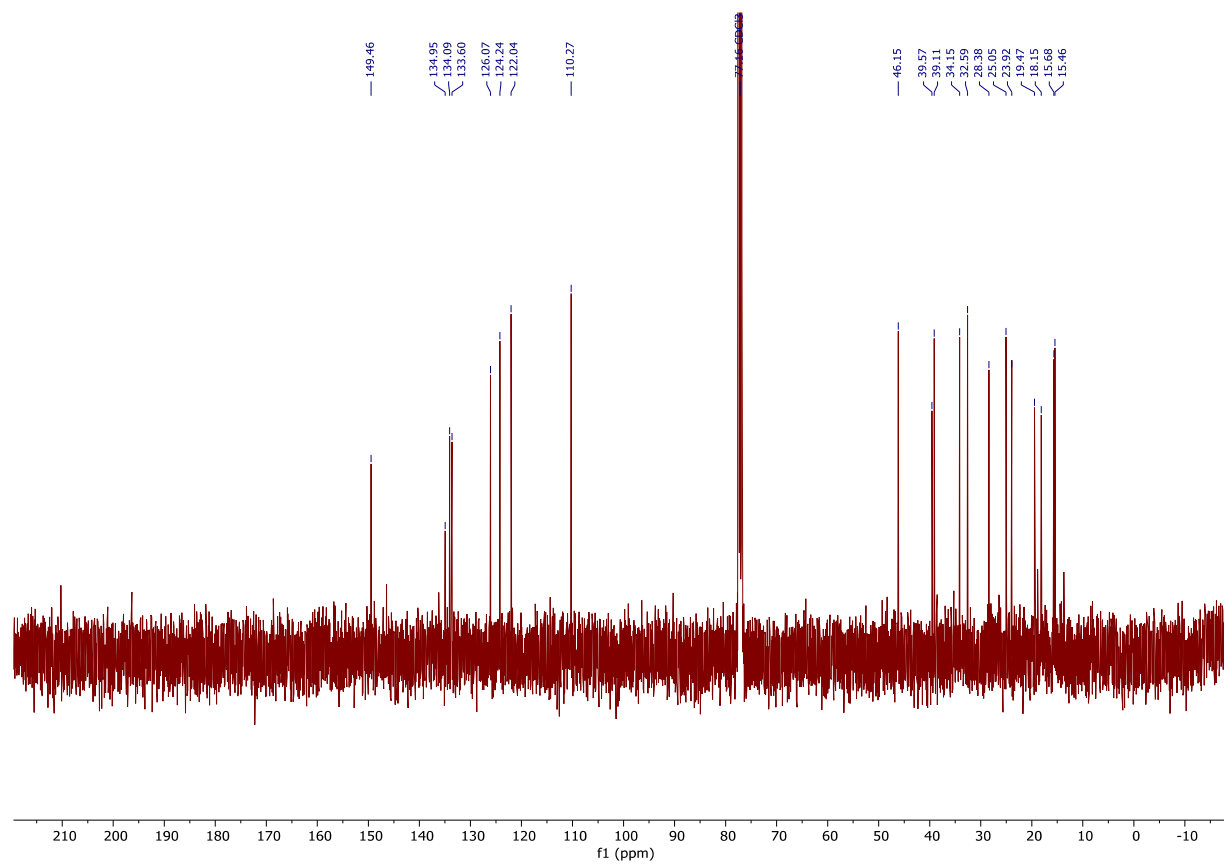


Figure 5: ^{13}C NMR spectrum of Cembrene A, 400 MHz, CDCl_3

ANNEXES

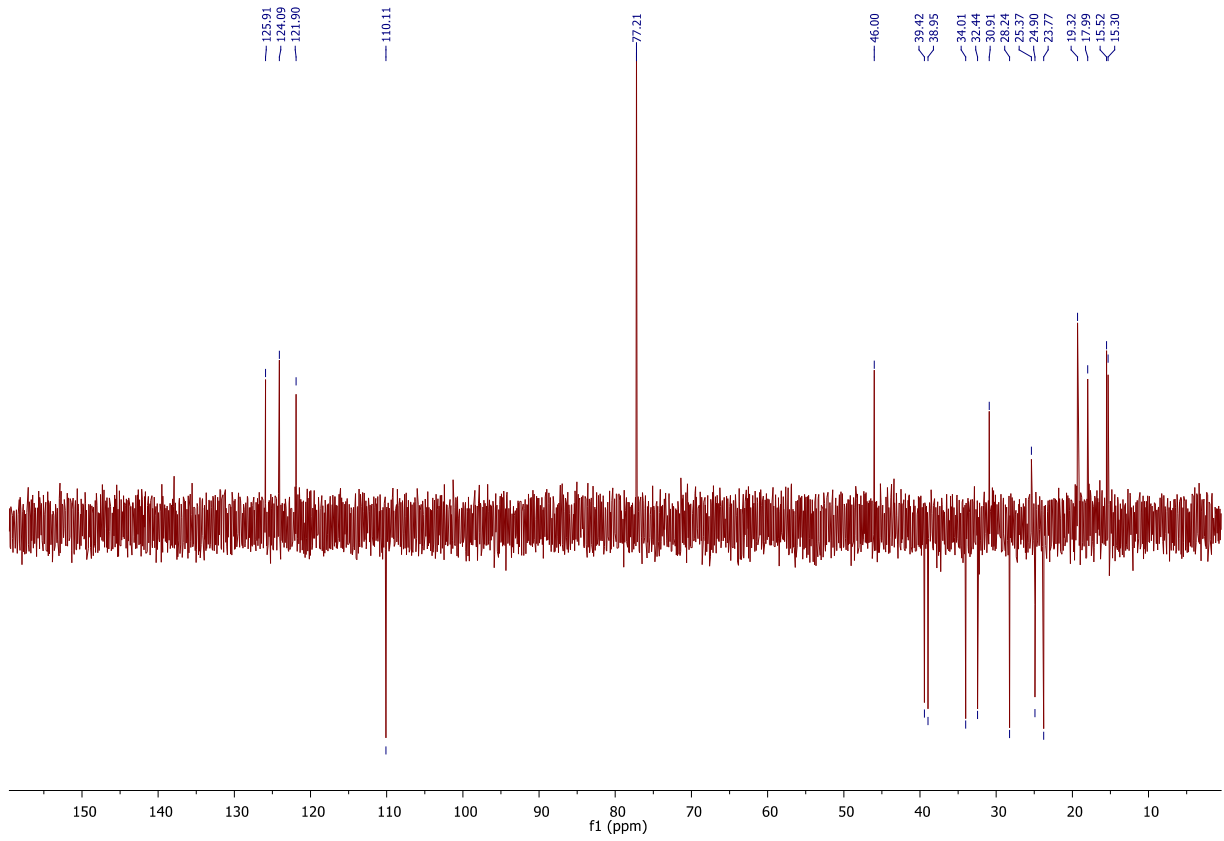


Figure 6: ^{13}C DEPT135 NMR spectrum of Cembrene A, 500 MHz, CDCl_3

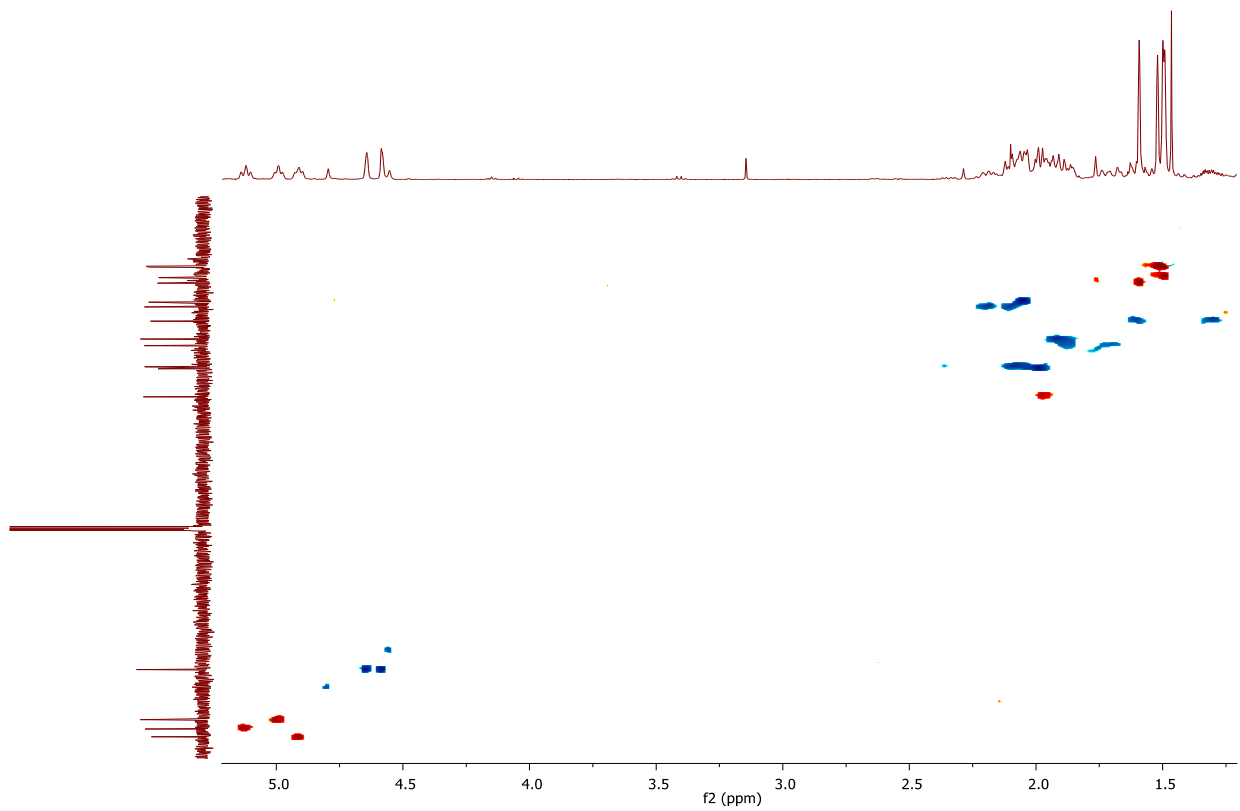


Figure 7: HSQC ^1H - ^{13}C 2D NMR spectrum of Cembrene A, 500 MHz, CDCl_3

ANNEXES

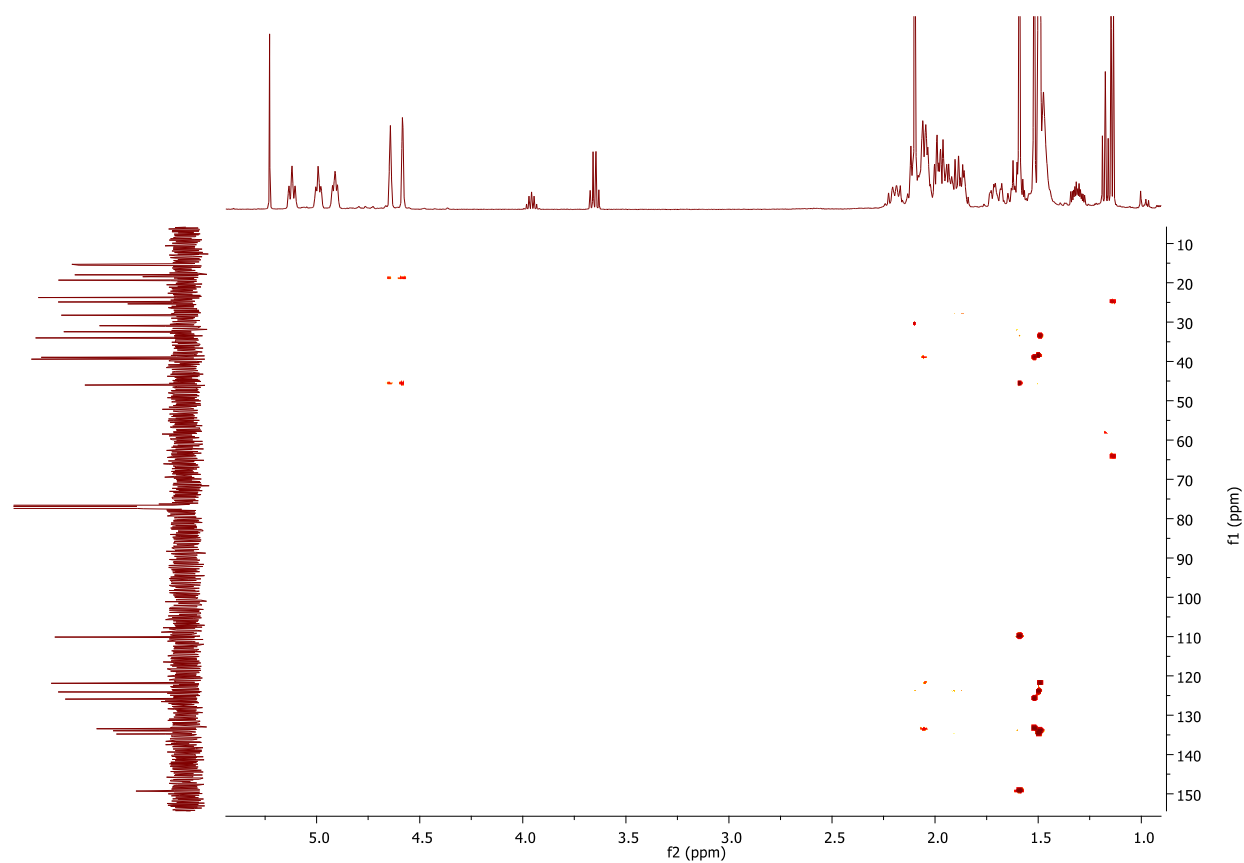


Figure 8: HMBC 2D NMR spectrum of Cembrene A, 500 MHz, CDCl_3

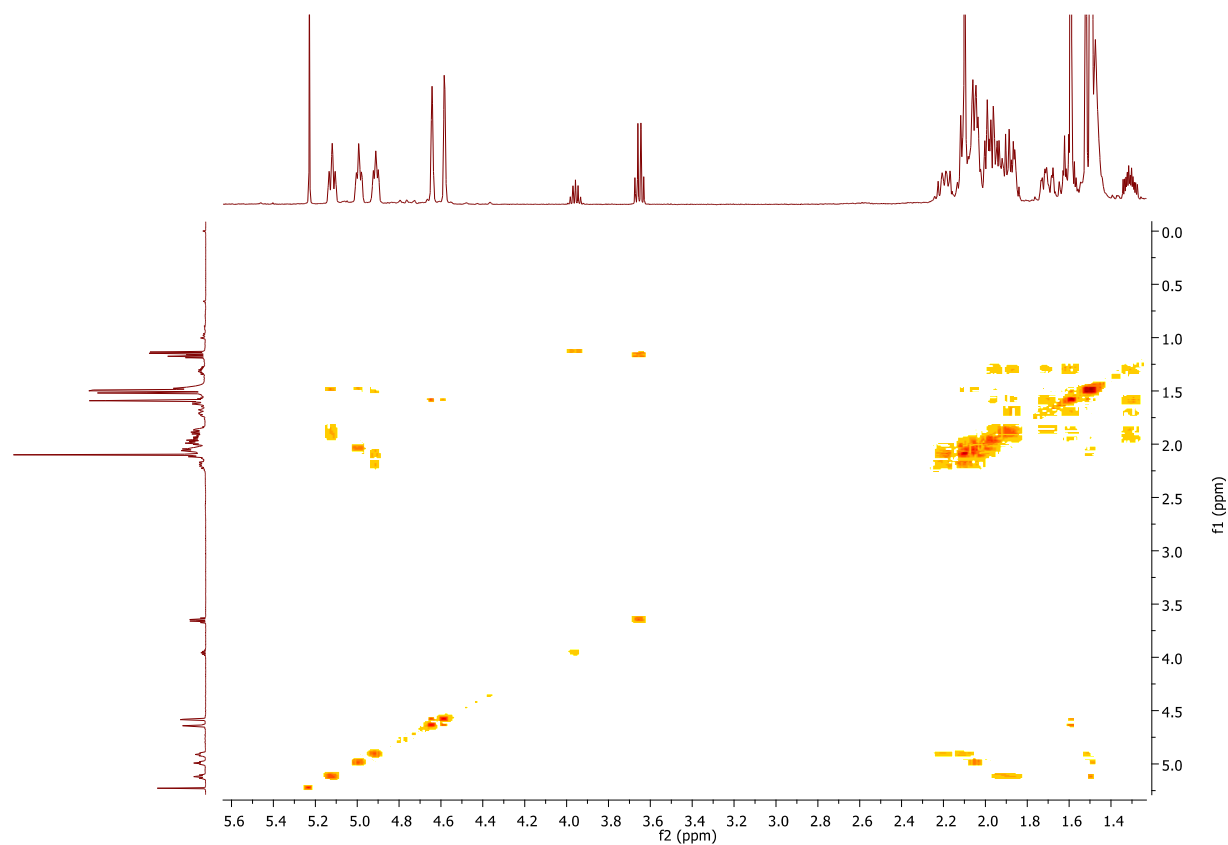
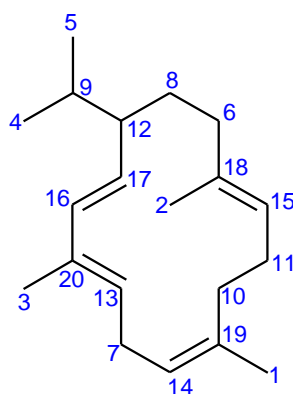


Figure 9: COSY ^1H - ^1H 2D NMR spectrum of Cembrene A, 500 MHz, CDCl_3

ANNEXES

Table 2 : NMR data of Cembrene, and its structure with corresponding attributions.

C	^{13}C δ (ppm)	Multiplicity, J (Hz)	^1H δ (ppm) by HSQC	COSY ^1H - ^1H	HMBC H \rightarrow C
1	14.46	CH ₃	1.39	4.72	10, 11a, 14
2	14.47	CH ₃	1.47	5.06 - 5.13, 4.95	2, (11a), 6a
3	20.09	CH ₃	1.65	2.95, 5.43	13, 16
4	20.19	CH ₃	0.68 - 0.72	1.38	5, 9
5	21.2	CH ₃	0.75	1.38, 1.85	4, 9
6	24.1	CH ₂	1.85 a	1.6, 1.12	8, 12
			2.19	-	-
7	26.8	CH ₂	2.25	5.43	14, 13, 11
			2.95	4.72, 5.43	-
8	28.5	CH ₂	1.12	1.55, 1.85	6a, 17, (6b), 9
			1.60	1.85, 1.1	7, 12
9	33.5	CH	1.38	1.55, 1.6	4, 5, 12
10	37.3	CH ₂	1.82	1.9, 2.1, 2.25, 1.39	1, 2, 14, 11b
			1.86	1.9, 2.1	-
11	39.6	CH ₂	1.90 a	1.8-1.9	2, 15, (6), 10
			2.10 b	4.95	
12	49.1	CH	1.55	5.06 - 5.13, 1.12, 1.6	4, 5, 9, 16, 17, (8)
13	126.3	CH	5.43	1.6, 2.25, 2.95, (4.9)	16, 3, (7b)
14	126.5	CH	4.72	2.25, 1.39	1, 7, 13
15	127.3	CH	4.95	1.47, 1.9, 2.1, (1.55)	11a, 2
16	131.5	CH (15.49 Hz)	5.99 - 6.01	5.06 - 5.13	3, 12, 16
17	131.6	CH (9.8 ; 15.48 Hz)	5.06 - 5.13	5.99 - 6.01	16, (2), 12
18	131.8	C	-	-	2, 15
19	133.1	C	-	-	1
20	135.8	C	-	-	16, 3, 17



ANNEXES

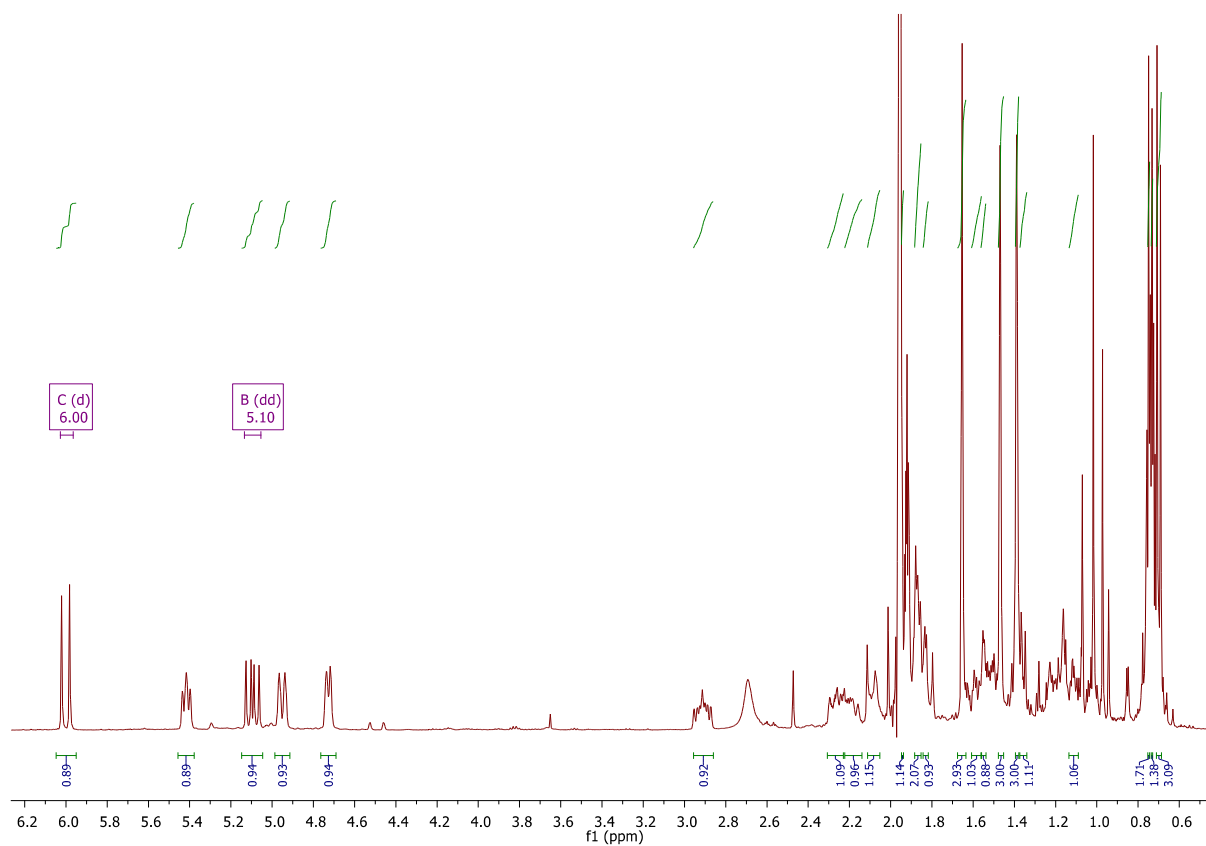


Figure 10: ^1H NMR spectrum of Cembrene, 400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

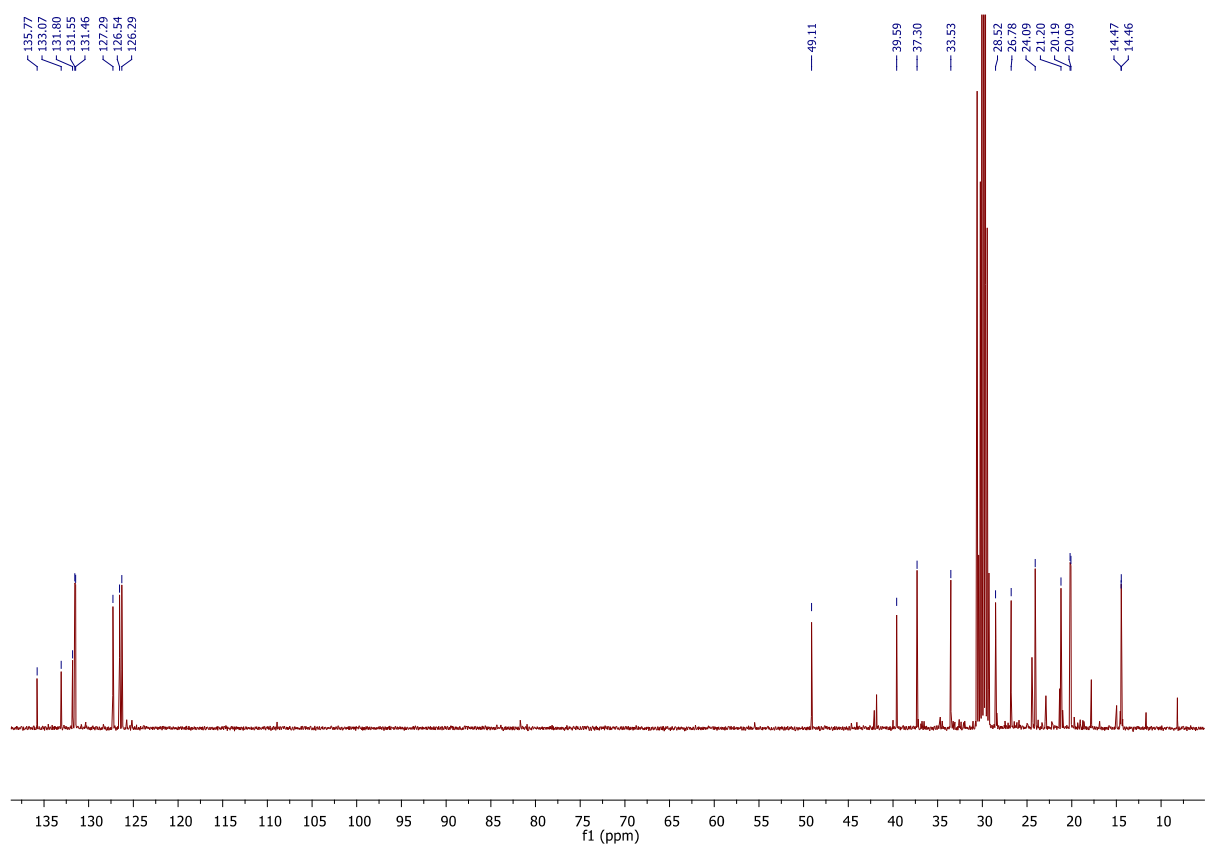


Figure 11: ^{13}C NMR spectrum of Cembrene, 400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

ANNEXES

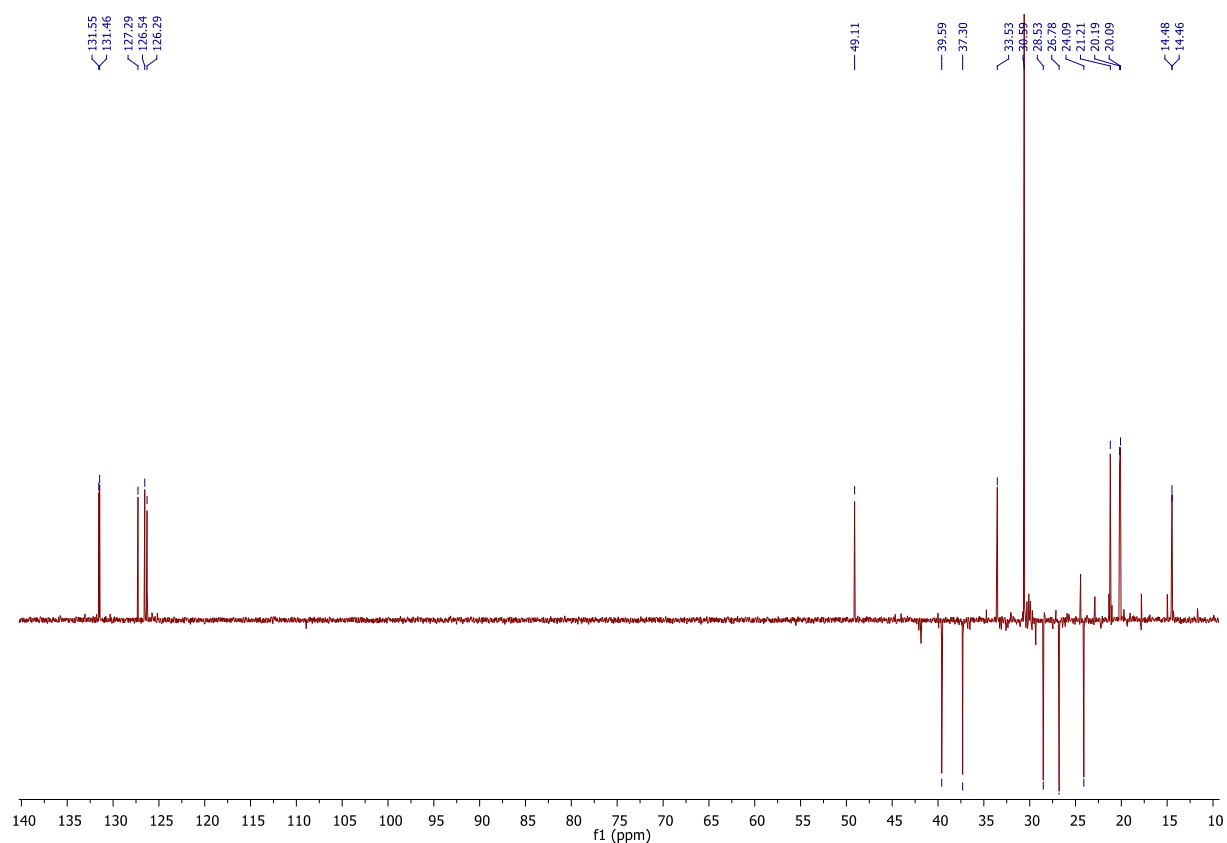


Figure 12: ^{13}C DEPT135 NMR spectrum of Cembrene, 400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

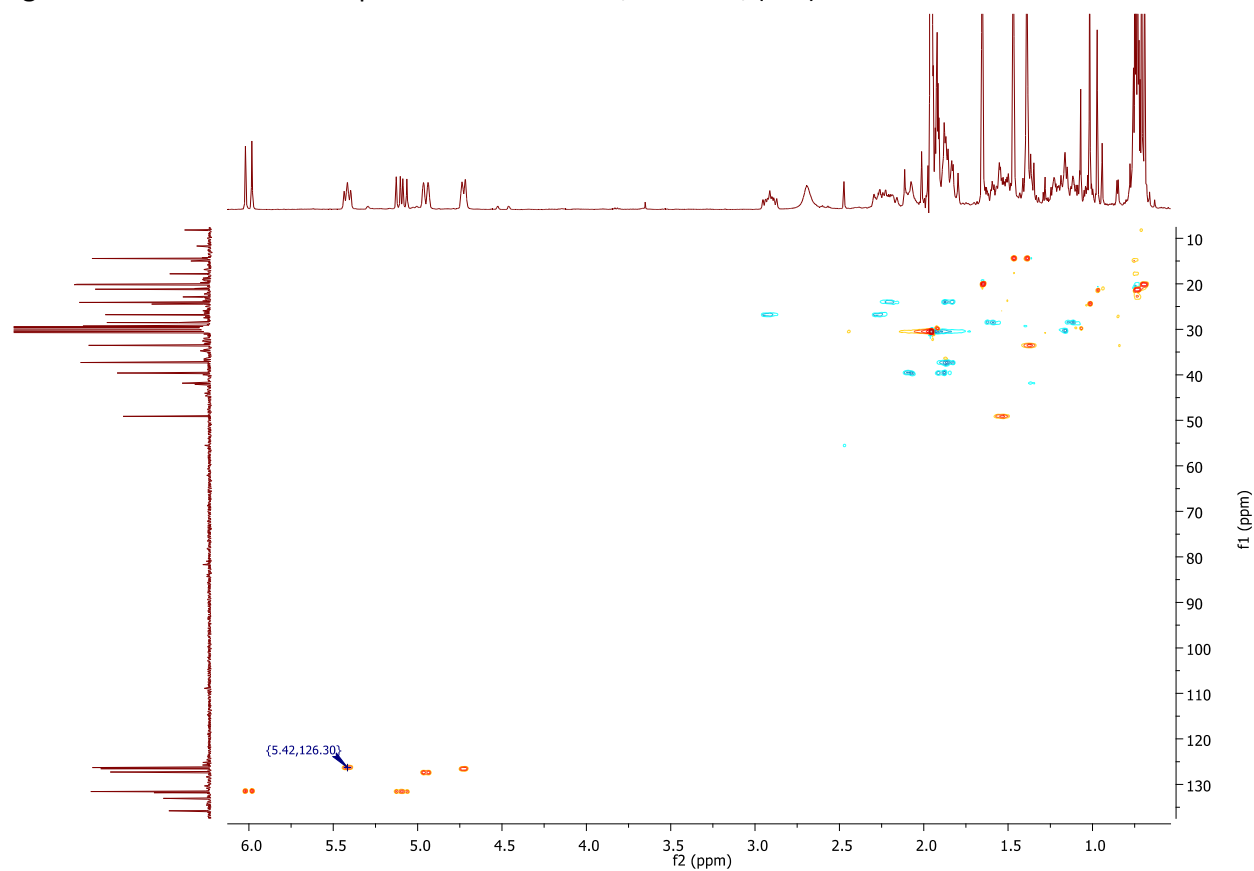


Figure 13: ^{13}C - ^1H HSQC 2D NMR spectrum of Cembrene, 400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

ANNEXES

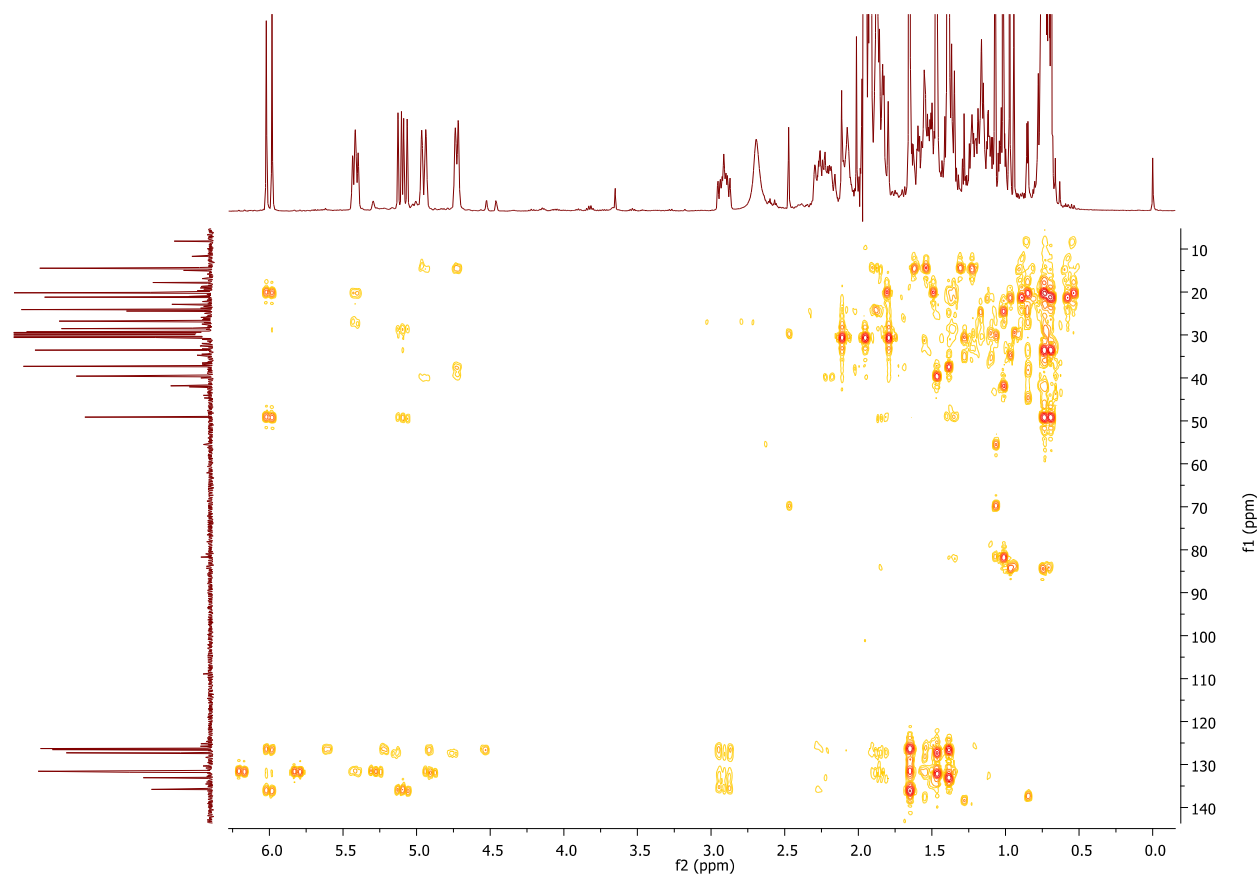


Figure 14: ^{13}C - ^1H HMBC 2D NMR spectrum of Cembrene, 400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

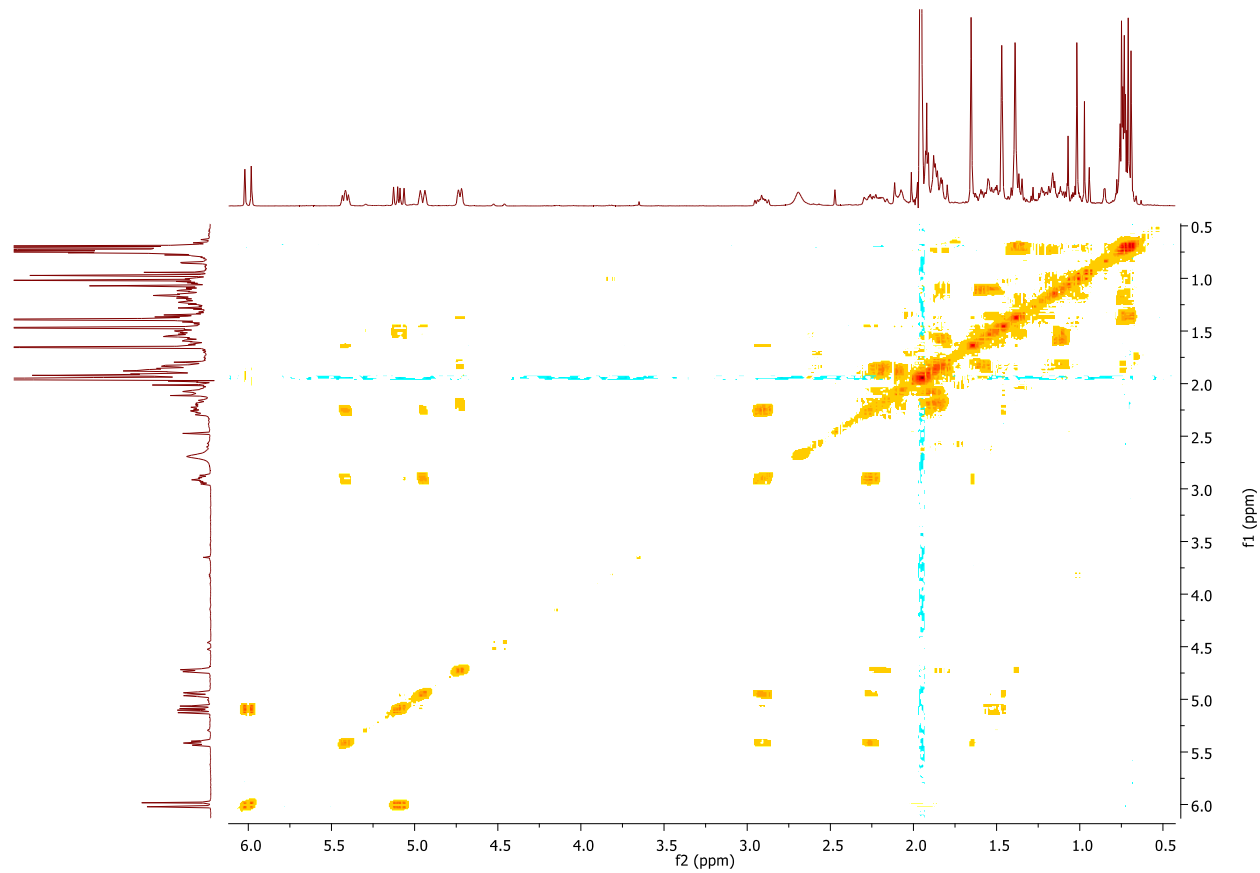
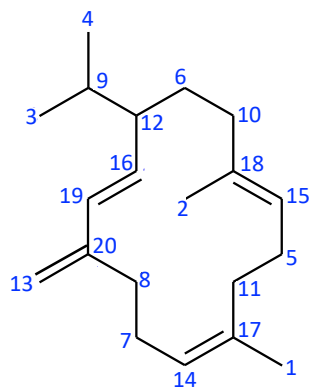


Figure 15: ^1H - ^1H COSY 2D NMR spectrum of Cembrene, 400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

ANNEXES

Table 3 : NMR data of isocembrene, and its structure with corresponding attributions.

C	^{13}C δ (ppm)	Multiplicity, J (Hz)	^1H δ (ppm) by HSQC	COSY ^1H - ^1H	HMBC H \rightarrow C
1	15.29	CH ₃	1.51	5.17	11, 14, 15
2	15.38	CH ₃	1.54	5.09, 4.87, 5.10	10, 15
3	19.77	CH ₃	0.85	1.48 - 1.55	4, 9, 12, (8)
4	20.30	CH ₃	0.87	1.48 - 1.55	3, 9, 12, (8)
5	24.24	CH ₂	2.05	-	-
			2.17	-	-
6	28.19	CH ₂	1.28	1.68 - 1.76,	-
			1.37	1.91 - 2.00	-
7	28.95	CH ₂	2.24	-	-
8	31.96	CH ₂	2.25	-	7
9	32.75	CH	1.48	1.51, 1.54	-
			1.55	-	-
10	37.31	CH ₂	1.91	1.28 - 1.37	-
			2.00	-	-
11	38.96	CH ₂	2.00	-	5, 14, 15
			2.08	-	-
12	49.83	CH	1.68 - 1.76	1.28 - 1.37, 5.56	-
13	112.06	CH ₂	4.87	-	8, 19
			5.10	-	-
14	125.17	CH	5.09	-	-
15	125.23	CH	5.17	2.24 - 2.25	-
16	131.62	CH	5.56	6.01	20
17	133.18	C	-	-	-
18	133.37	C	-	-	-
19	133.48	CH	6.01	5.56	8, 12, 13
20	147.20	C	-	-	-



ANNEXES

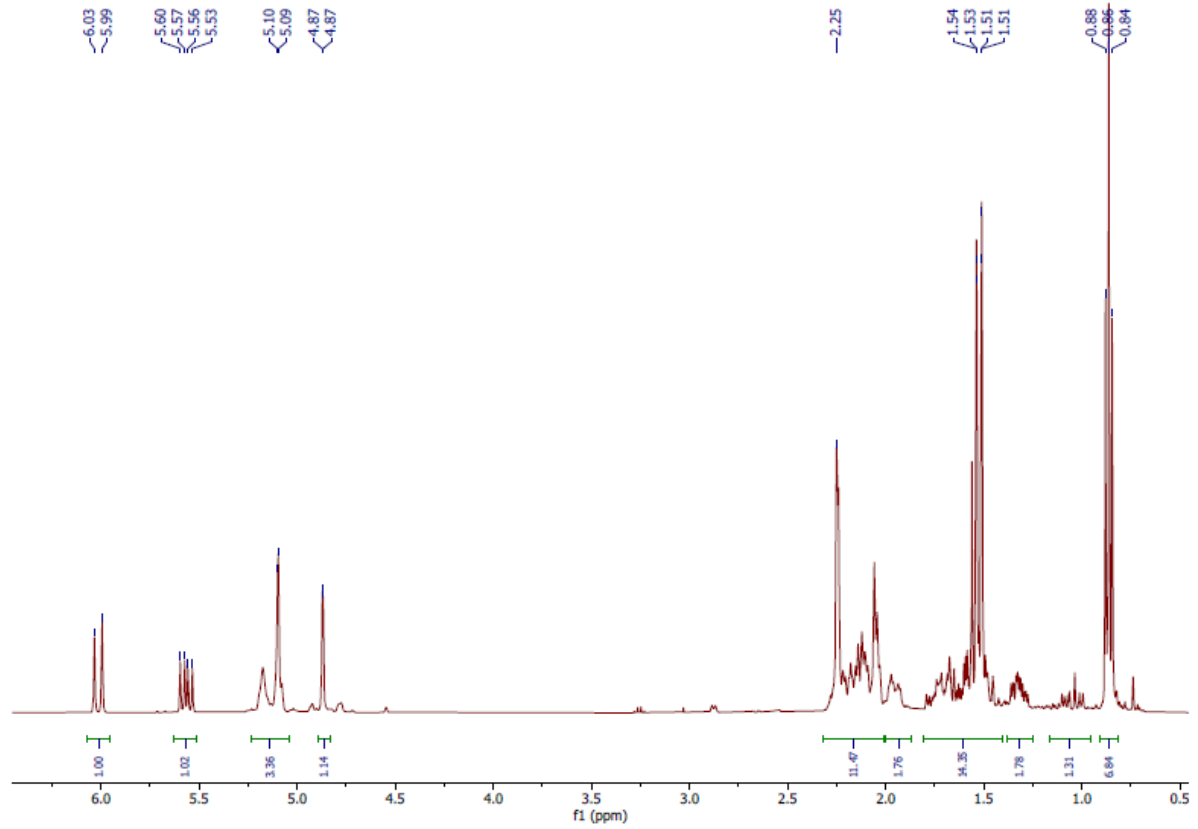


Figure 16: ^1H NMR spectrum of isocembrene, 400 MHz, C_6D_6

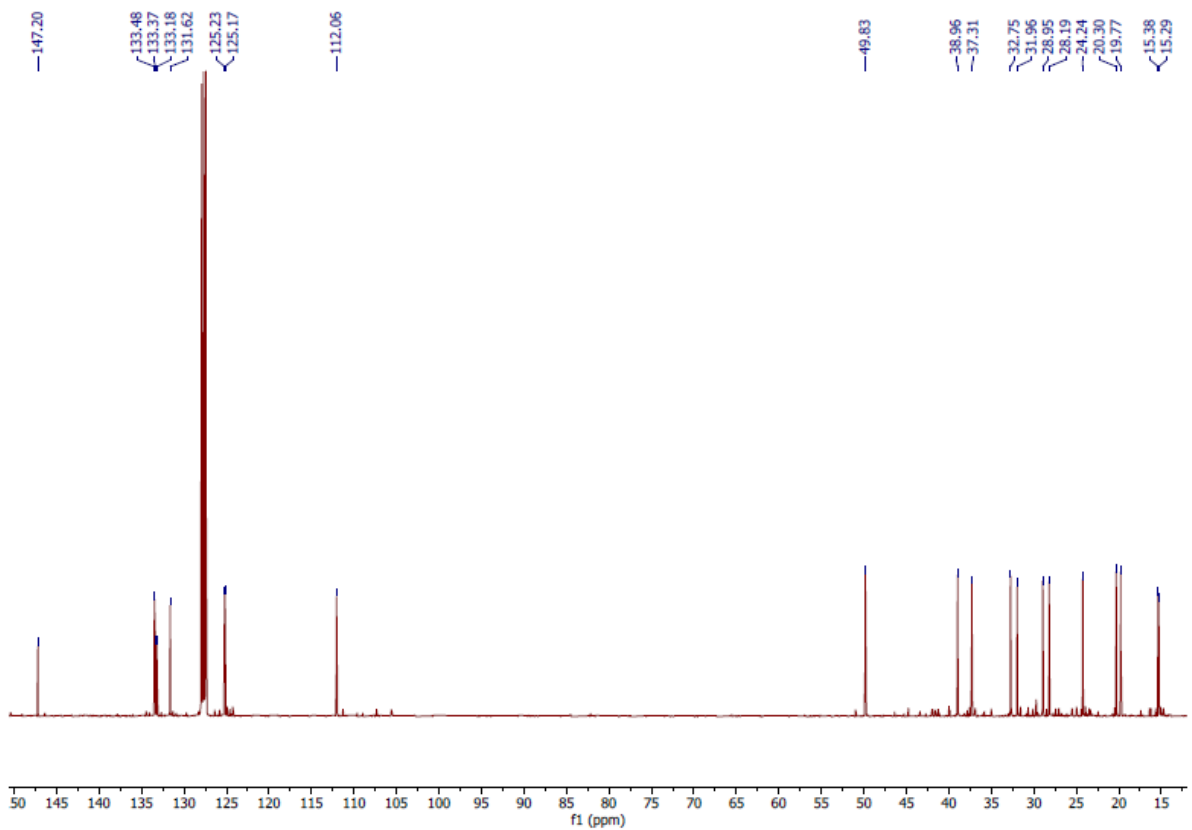


Figure 17: ^{13}C NMR spectrum of isocembrene, 400 MHz, C_6D_6

ANNEXES

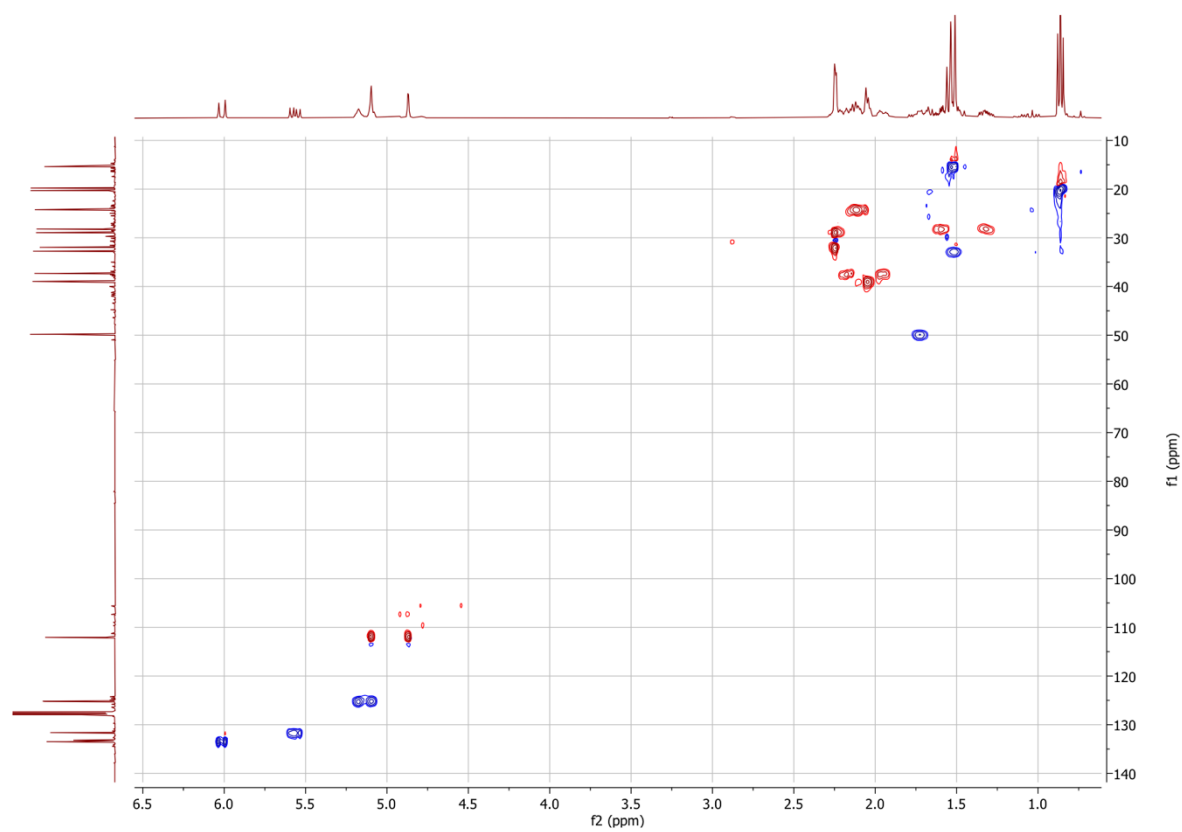


Figure 18: ^{13}C - ^1H HSQC 2D NMR spectrum of isocembrene, 400 MHz, C_6D_6

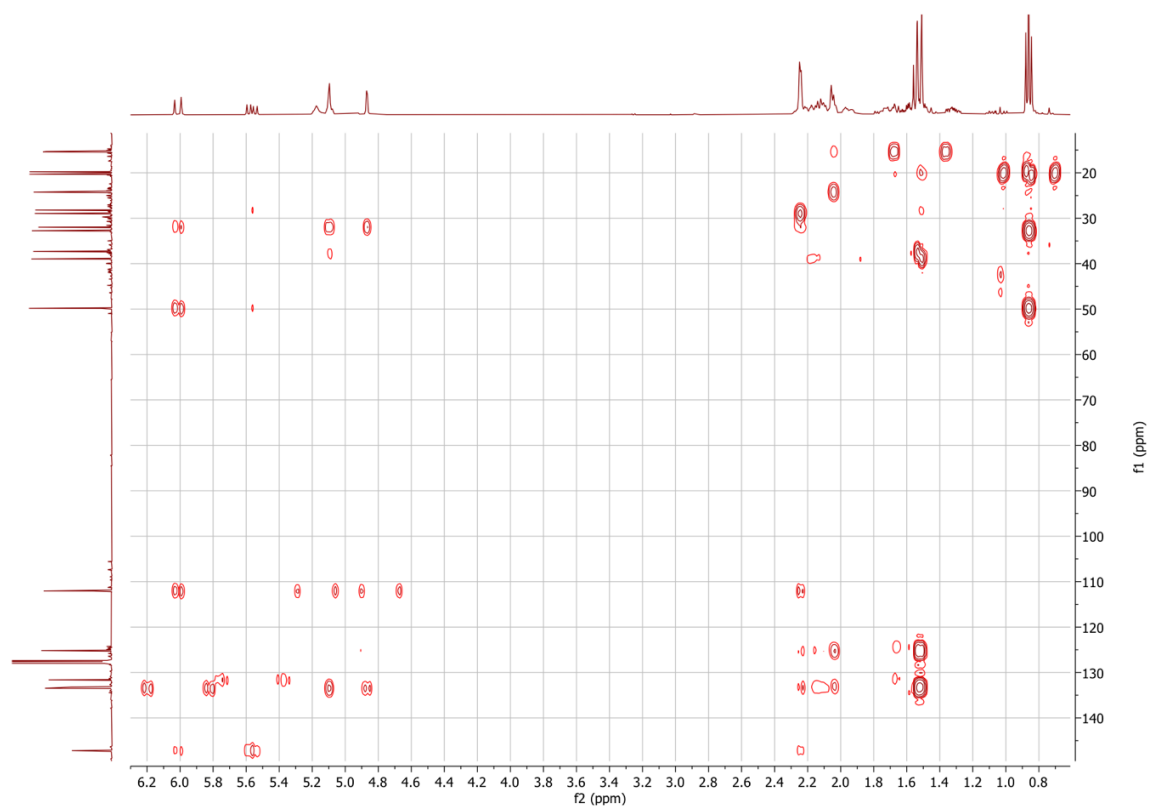


Figure 19: ^{13}C - ^1H HMBC 2D NMR spectrum of isocembrene, 400 MHz, C_6D_6

ANNEXES

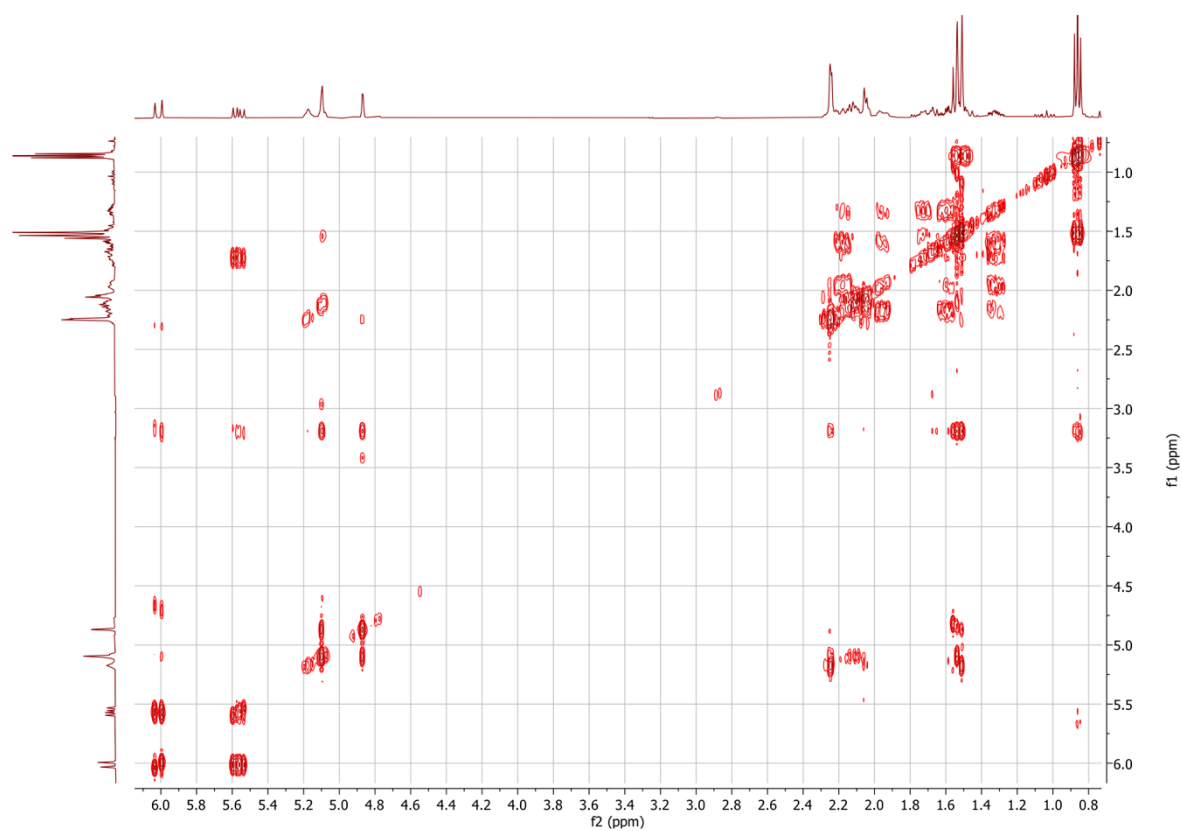


Figure 20: ¹H - ¹H COSY 2D NMR spectrum of isocembrene, 400 MHz, C₆D₆

ANNEXE 3: Procédure expérimentale permettant l'obtention d'acides boswelliques.

Le protocole d'extraction des acides boswelliques a été adapté à partir de celui de Schmiech et al. [134], et a été appliqué sur le résidu de distillation d'encens *B. sacra*.

Le résidu de distillation brut non séché a été soumis à une extraction par Soxhlet à l'éthanol. L'extrait éthanolique (15.6g) a été soumis à une extraction acido-basique. La fraction acide obtenue a été analysée par RMN pour l'identification des acides d'intérêt. Les données RMN du carbone de la fraction acide de l'extrait EtOH sont présentées ci-dessous.

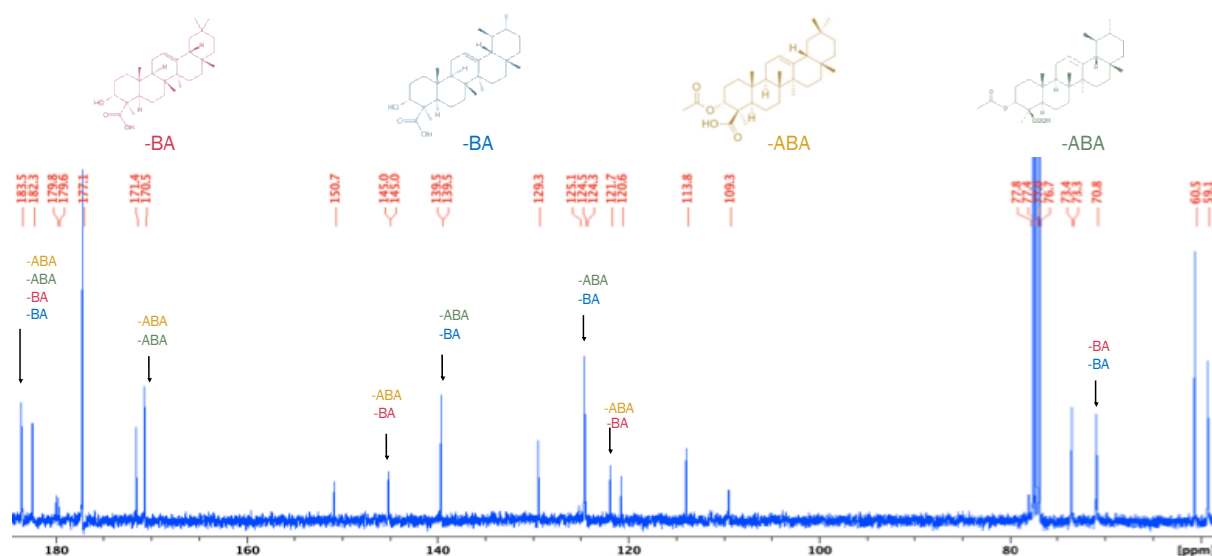
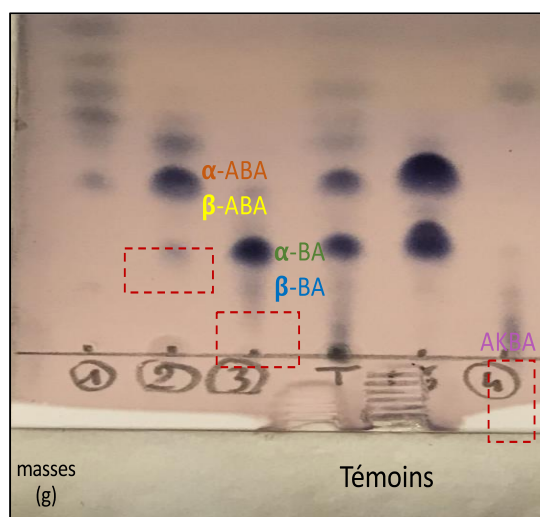


Figure 1 : Spectre RMN ^{13}C (256 scans, CDCl_3 , 400 MHz) de la fraction acide du résidu de distillation de *B. sacra*. Les noms des composés sont reportés au-dessus des signaux leur correspondant.

Ensuite, le protocole a été appliqué sur une plus grande quantité de résidu brut non séché (500g, 1.3L EtOH), et extrait par Soxhlet durant 23h. L'extrait (212g) a été mis en solution (NaOH aq, 6M) et a été extrait à l'acétate d'éthyle et décantée. Ensuite, les phases organiques ont été rassemblées, séchées sur MgSO_4 et évaporées, donnant la fraction neutre (178g). La phase aqueuse a été acidifiée à $\text{pH} = 3$, extraite à l'acétate d'éthyle pour donner la fraction acide, séchée et évaporée. Les composés de cette fraction acide ont été séparés par chromatographie sur gel de silice, et ont donné 4 fractions, dont les résultats CCM sont visibles ci-contre.

Figure 2 : CCM des fractions de la partie acide de l'extrait EtOH du résidu de distillation de *B. sacra*. Les composés α - et β -ABA ont été vus dans la fraction 2 (6.5g), α - et β -BA dans la fraction 3 (8g) et l'AKBA dans la fraction 4 (1.6g). Éluants PE/DE 4:1; révélateur : anisaldéhyde. Témoins : extrait EtOH et fraction acide.



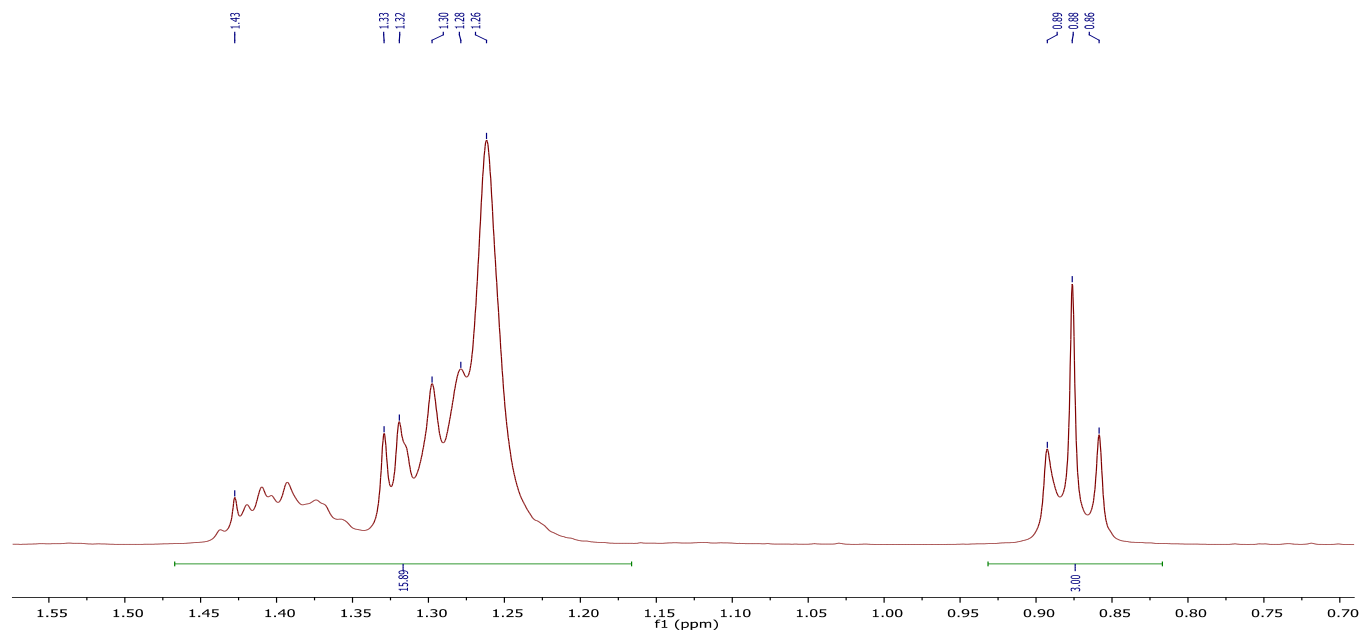
Suite à cela, une étape de purification sur colonne de silice en phase inverse ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MeOH}$) permet de séparer et isoler ces composés.

ANNEXE 4 : Étude des odorants de *B. sacra*

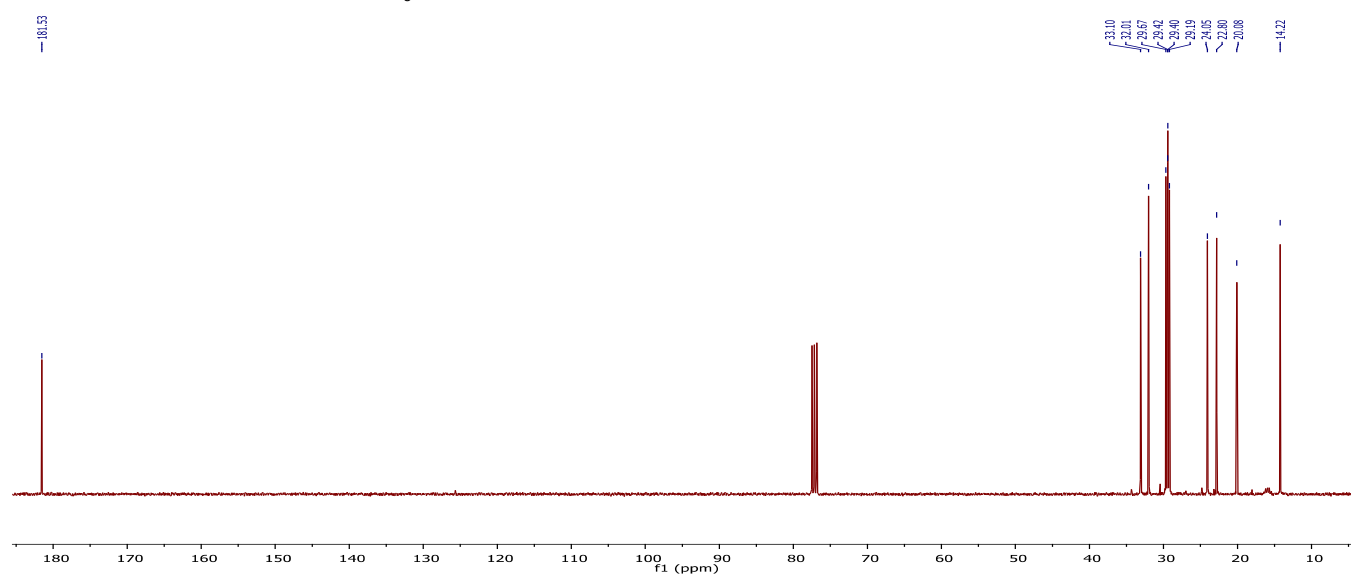
Validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the accurate quantification of olibanic acids by stable isotope dilution in several essential oils of *B.sacra* from diverse origin

Kimberley Massei, Elise Carenini, Nicolas Baldovini

1. NMR Data

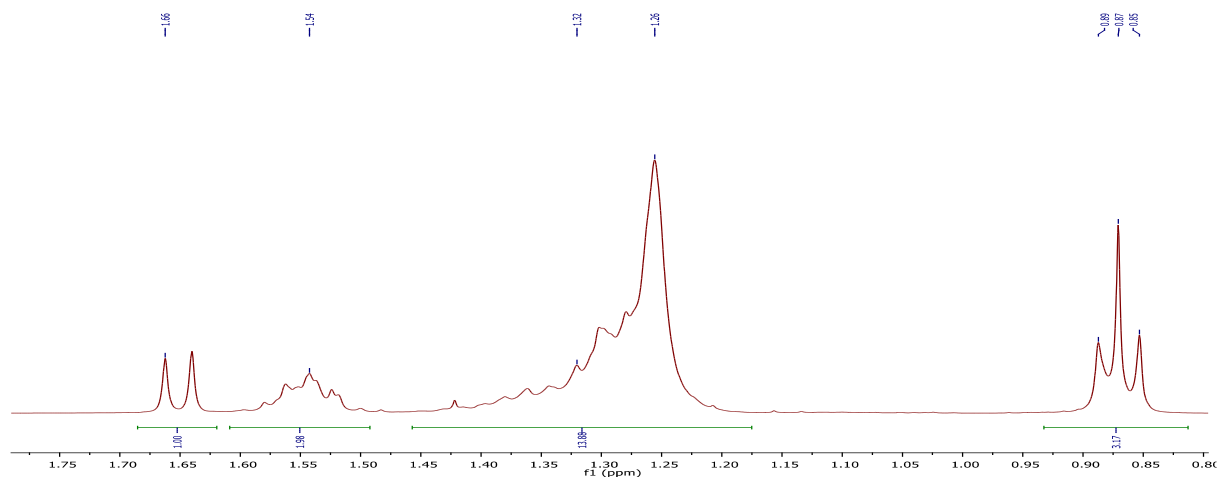


¹H NMR spectrum (400 MHz, CDCl₃) of compound ²H₂-trans-2-octylcyclopropyl carboxylic acid

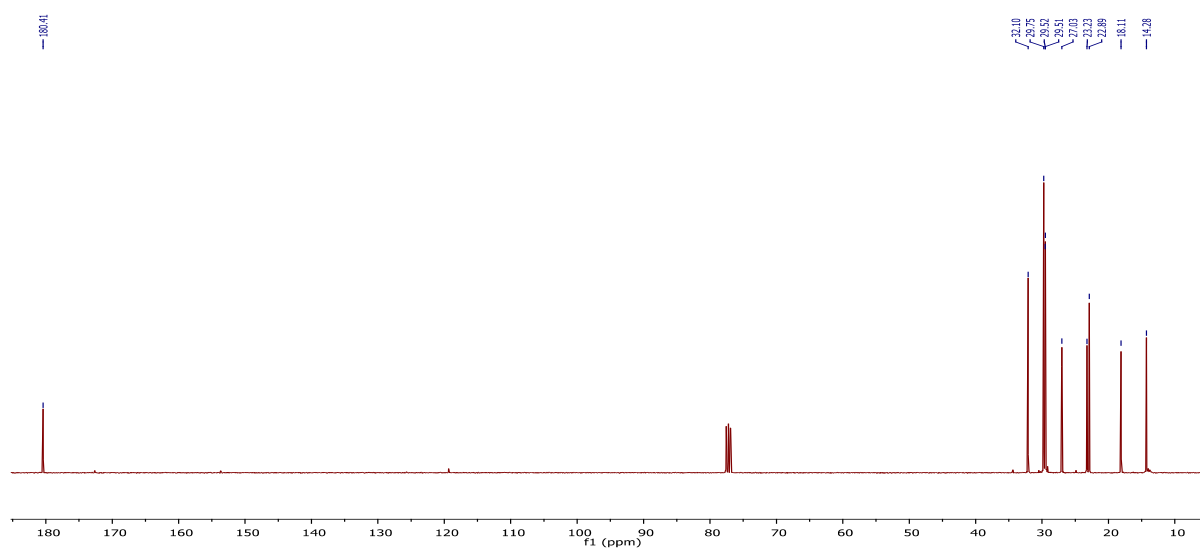


¹³C NMR spectrum (400 MHz, CDCl₃) of compound ²H₂-trans-2-octylcyclopropyl carboxylic acid

ANNEXES



^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) of compound $^2\text{H}_2$ -cis-2-octylcyclopropyl carboxylic acid

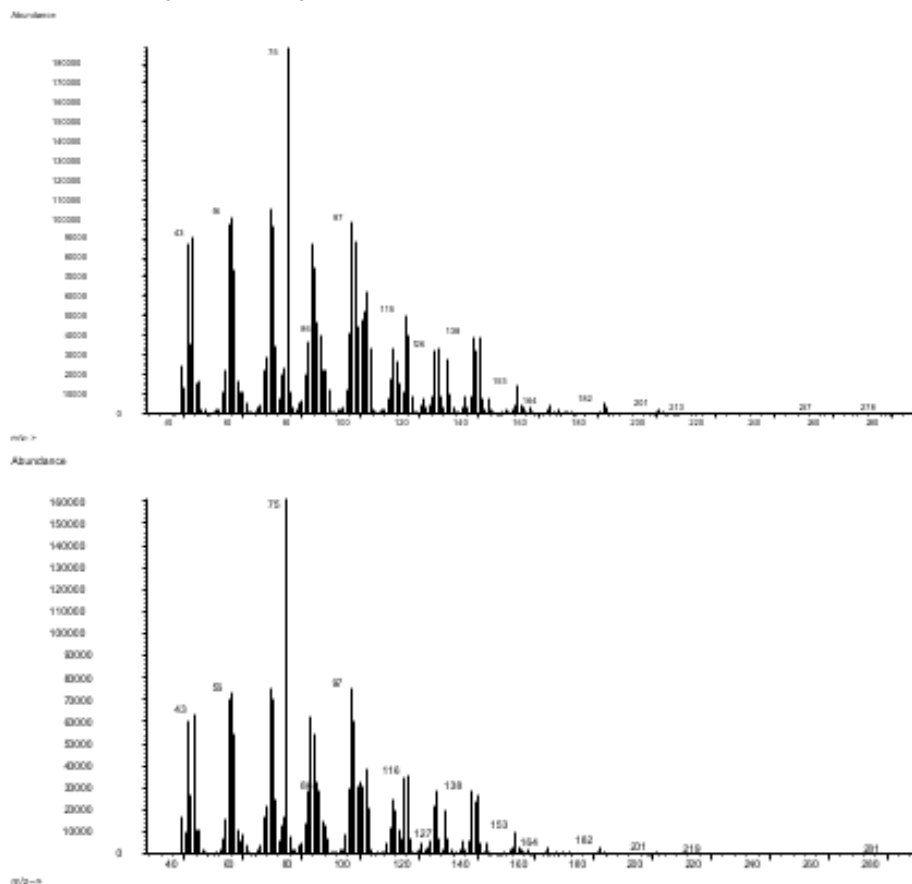


^{13}C NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) of compound $^2\text{H}_2$ -cis-2-octylcyclopropyl carboxylic acid

Table 1 : ^1H and ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) shifts of the labelled compounds

$^2\text{H}_2$ -trans-2-octylcyclopropyl carboxylic acid				$^2\text{H}_2$ -cis-2-octylcyclopropyl carboxylic acid			
Position	δ_{H} (ppm)	mult	δ_{C} (ppm)	Position	δ_{H} (ppm)	mult	δ_{C} (ppm)
1	-	-	181.53	1	-	-	180.41
2	1.33	m	24.05	2	1.66	d	18.11
4	1.30	m	20.08	4	1.32	m	23.23
5	1.28	m	33.10	5	1.54	m	27.03
6-11	1.26	m	29.19, 29.40, 29.42, 29.67, 32.01, 22.80	6-11	1.26	m	29.51, 29.52, 29.75, 32.10, 22.89
12	0.88	t	14.22	12	0.87	t	14.28

2. Mass spectrometry Data



A : $^2\text{H}_2$ -(\pm)-trans-2-octylcyclopropyl-carboxylic acid

B : $^2\text{H}_2$ -(\pm)-cis-2-octylcyclopropyl-carboxylic acid

3. Synthesis of d_2 -olibanic acids

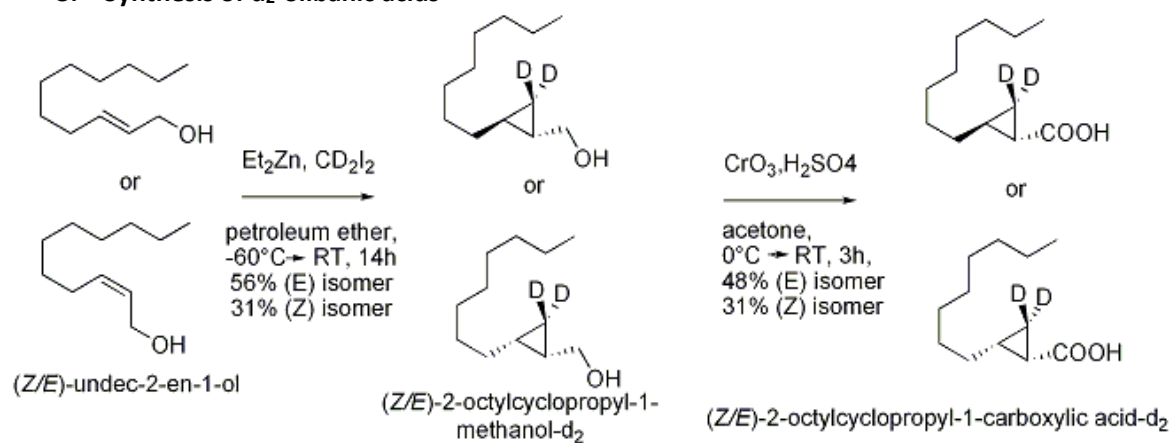
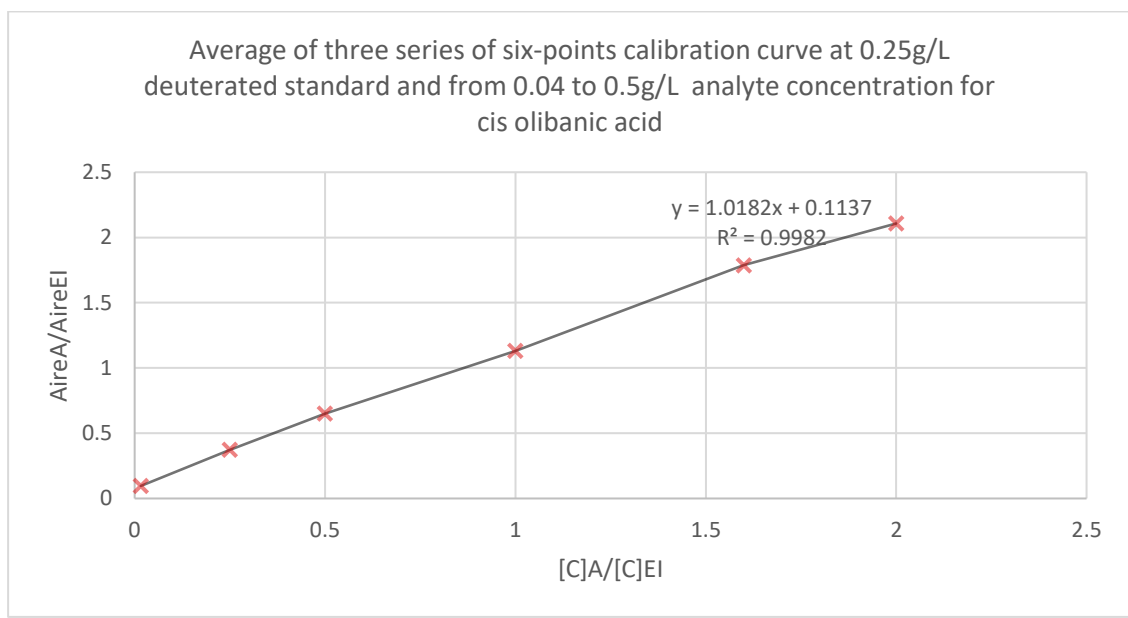
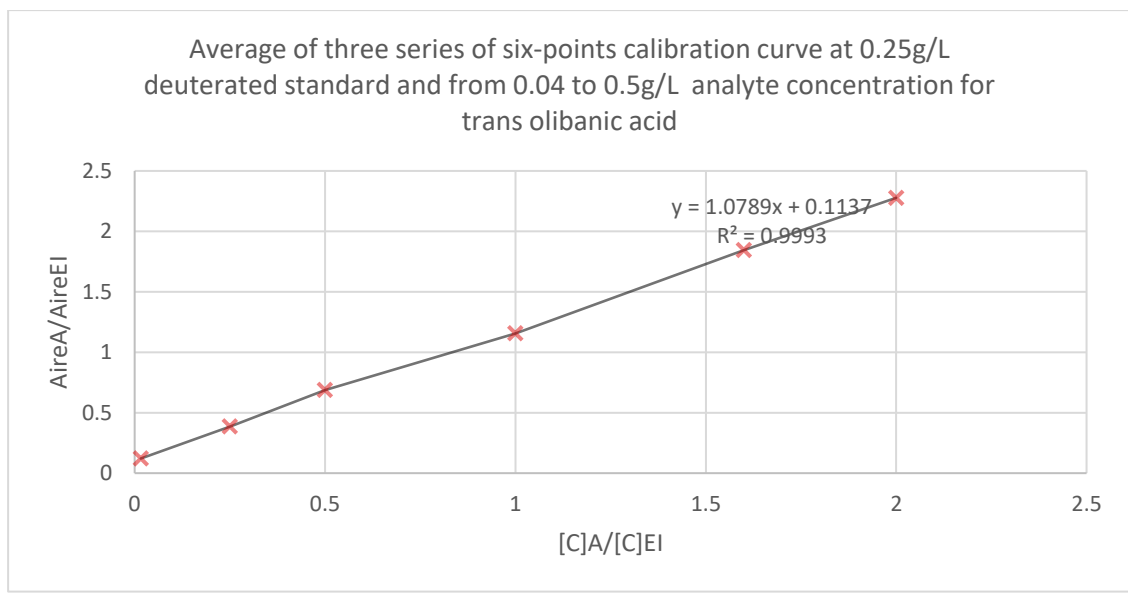


Fig. 2. General process for the synthesis of deuterated reference compounds

4. Calibration curves

ANNEXES



ANNEXE 5 : Étude des composés volatils de *C. myrrha*, partiellement basée sur la revue en préparation

Volatile constituents of myrrh essential oil from fragrant *Commiphora* species: a review

Abstract:

A comprehensive review of volatile constituents of Myrrh species is presented here. Since ancient times, myrrh has been the center of researches for its fragrant and medicinal value. During the last century, phytochemical investigations of myrrh resin, aerial parts or roots, led to the identification of over 350 compounds. Among these molecules, only reported volatile compounds from the resin, such as light terpenoids, were reviewed here. This review aims to discuss the present state of knowledge of myrrh resin volatile composition.

Keywords: myrrh; essential oil; *Commiphora*; oleogum-resin; fragrance

1. Analytical Aspects

Analytical research on the constituents of MEO began in the 1960s, with the development of gas chromatography and the invention of capillary columns by M. Golay in 1957. A work on the previous data on opopanax was reviewed by Guenther in the 1950s, with the identification of monoterpenes. Then, the first analytical investigation of opopanax oil began a few years later with the isolation of sesquiterpene hydrocarbons, bisabolene isomers [322,323]. A few years later, eighteen cyclic sesquiterpenes were found in opopanax oil, including bisabolane-type sesquiterpenes, but also bergamotane, copaene **46**, muurolane, cadinene, and menthane skeletons.[324] It was well into the 1980s before the first work on *C. myrrha*, and on the identification of furanosesquiterpene in myrrh was published [180,325,326]. Then, in 1983, the first quantitative manuscript on the composition of myrrh essential oil was published, thanks to significant advances in analytical chemistry and the development of methods used for quantification [190]. The structures of the main components of MEO, the furanosesquiterpenes, were elucidated by the pioneering work of Dekebo et al. and Brieskorn and Noble in the late 20th and early 21st centuries. At that time, the major compounds of myrrh oil were already characterized by modern analytical techniques using NMR, GC-mass spectrometry, IR spectroscopy and UV analyses. However, some minor compounds were identified based on GC-MS data alone, which is not always sufficient to properly characterize compounds, even when comparing their mass spectra and retention indices to those of reference compounds. Chemical synthesis and injection of standards in GC could be a key to ensure the identity of a compound.

From this period of the 1980s to the beginning of the 21st century, chemical investigations relative to myrrh composition were deepened, and the most complete review today remains that of Hanuš et al., published in 2005 on the chemistry of *Commiphora*. They managed to report more than 300 compounds, of which as many as 200 could be found in the oil of various *Commiphora* species [172]. Finally, when reviewing previously published results on myrrh oil, different classes of compounds were found such as: monoterpenes, sesquiterpenes and several diterpenes. Shen et al., also examined the composition of MEO, as well as the uses and the biological properties of different *Commiphora* spp., four years later. Finally, some theses also provided us with additional information on the composition and pharmacology of myrrh. However, since that time, some species have not been studied and little literature on species such as *C. wildii* or *C. kua* was available. Furthermore, many new compounds have been identified in these newly described species but also new investigations have also expanded

the phytochemical knowledge of the older and more famous myrrh species, and these compounds are presented in this review.

With increasingly efficient technologies, a deeper characterization of myrrh constituents has been possible with the robust and powerful technologies used recently. For example, the first and only report on myrrh composition with two-dimensional gas chromatography was in 2019, where Rubegeta and al. compared the chemical composition of seven different myrrh species [184]. Their study showed that sesquiterpene represents the major class of volatile compounds present in all *Commiphora* species. In addition to sesquiterpenic compounds, monoterpenic compounds were identified in all species. However, the composition of MEO has not yet been studied by GCxGC, and MEO still contains uncharacterized compounds that could be more accurately identified using these new technologies. The use of these relatively new technologies will allow more accurate characterization of compounds and avoid misidentification of compounds.

Regarding the wide distribution of *Commiphora* species, the volatile constituents of MEOs could vary in concentration from one sample to another, however, homogeneity can even be observed in the composition of MEOs for the same species reported in the literature. For instance, major constituents of *C. myrrha* oil are reported to be furanosesquiterpenes, representing about 50-70% of total oil, according to the literature [161,168,170]. For instance, Morteza-Semnani et al., published the content of *C. myrrha* oil and counted about 69% furanosesquiterpenes, sesquiterpene hydrocarbons about 17%, and other oxygenated sesquiterpenes about 7%. However, no monoterpenic compound was identified in this work. Marcotullio et al. also reported the composition of *C. erythrea* with ca. 50% furanosesquiterpenes, monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons, which represent respectively about 6% and 37% of the total oil, monoterpenes and sesquiterpene alcohols, representing less than 1% and about 3% of the oil, respectively, and around 1% sesquiterpene ketones [162]. However, previous authors showed that *C. erythrea* was characterized by a high content of trans- β -ocimene **4**, and that it was not found in *C. myrrha*.

We report herein (Table 1) a large number of volatile organic compounds that have been identified in several *Commiphora spp.* resins mentioned above. The compounds are reported and classified according to their structure, allowing discussions about the role of chemical functions for fragrant or medicinal properties.

ANNEXES

TABLE 1
Constituents of *Commiphora spp*

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurence	Identification
Acyclic monoterpenes					
1	β -Myrcene	123-35-3	136	TH; C; SP; M; G; K; E; A; OG; CF; PS; OP; T; W; O	GC-MS[162,163,167,184,303,327–332]; GC[333]; IR[333], St[329], GLC-MS[334,335]
2	Linalool	78-70-6	154	M; OP; TH; W	GC-MS[329,336,337], GLC[335][338]
3	Cis- β -ocimene	3338-55-4	136	T; G; CF; PS ; WD ; G ; E	GLC-MS[334], GC-MS[170,184,339,340]
4	Trans- β -ocimene	3779-61-1	136	T; G; M; WD; G; E	GLC-MS[334], GC-MS[170,188,339,341], ¹³ C NMR[189]; ¹ H NMR[189]
5	(E)- β -ocimene epoxide	28977-57-3	152	G	GC-MS[170]
6	Isolinalyl acetate	40882-96-0	196	M	TS[342], ¹ H NMR[342]
Menthane monoterpenes					
7	Limonene	138-86-3 ¹	136	T; TH; C ; M; G; E; O; P; K; S; CP; A; OG; G; WD; OP; W	GC-MS[162–164,170,303,327–331,333,334,339,343–347], GC-EAD[338] , St[327,338,338,339,344,346]; GC[333]; IR[333], GLC-MS[334,335],
8	α -phellandrene	99-83-2	136	S; A; CF; PS; OP; W	GC-MS[184,303,329,331], GLC[335]
9	β -phellandrene	555-10-2	136	WD; P; PL; K; S; OP; W	GC-MS[329–331,344]
10	Menthol	1490-04-6	156	W	GC-MS[330]
11	Carvacrol	499-75-2	150	M	GC-MS[348]
12	p-cymene	99-87-6	134	T; E; WD; O; PL; S; K; A; CP; B; CF; G; H; M; PS; W	GLC-MS[334], GC-MS[162,184,303,328,330,331,339,344,346], St[338,339]
13	α -terpineol	98-55-5	154	T; O; CF; PS; WD; OP ; W	GLC-MS[334,335], GC-MS[184,329,331,338,339]
14	4-terpineol	562-74-3	154	T; E; O; PL; S; K; A; CP; B; CF; H; PS; WD; OP	GLC-MS[334], GC-MS[162,184,303,328,329,331,339,346]
15	α -phellandrene-epoxide	288393-04-4	152	PL	GC-MS[331]
16	carvone	99-49-0	150	T; OP	GLC-MS[329,334]
17	α -Terpinolene	586-62-9	136	G; O; PL; S; OP	GC-MS[329,331,338]; GC[333]; IR[333]
18	α -terpinene	99-86-5	136	PL; S; OP; M	GC-MS[329,331,336,349]

ANNEXES

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurrence	Identification
19	γ -terpinene	99-85-4	136	T; WD; PL; S; OP; W	GLC-MS[334], GC-MS[329–331,339,344], St[339]
20	p-cymen-8-ol	1197-01-9	150	T; WD; OP	GLC-MS[334], GC-MS[329,338,339]
<i>carane monoterpenes</i>					
21	δ -3-carene	13466-78-9	136	TH; C; T; G; E; G; PL; K; A; OG; OP; M; W	GC-MS[162,303,327,329–331,336,346,350], St[327], GLC-MS[334], ¹³ C NMR[350]; ¹ H NMR[350]; GC[333]; IR[333]
22	4-carene	29050-33-7	136	M	GC-MS[351]
<i>thujane monoterpenes</i>					
23	α -thujene	2867-05-2	136	TH; C; T; E; O; K; S; A; OG; WD; OP; W	GC-MS[162,303,327–331,339,346,352], GLC-MS[334]
24	β -thujene	28634-89-1	136	T;	GLC-MS[334]
25	α -thujone	546-80-5	152	T; H; PS	GLC-MS[334], GC-MS[184]
26	Sabinene	3387-41-5	136	TH; C; T; E; G; PL; S; K; A; OG; CP; CF; H; PS; WD; OP; W	GC-MS[162,184,303,327–331,339,346], St[327,339], GLC-MS[334]; GC[333]; IR[333]
27	Sabinene hydrate	546-79-2	154	WD; OP	GC-MS[329,339]
<i>pinane monoterpenes</i>					
28	pinocarvone	30460-92-5	150	T; OP	GLC-MS[334], GC-MS[329]
29	Myrtenal	564-94-3	150	T; WD; OP	GLC-MS[334], GC-MS[329,339]
30	myrtenol	515-00-4		T; PL; WD; AB	GLC-MS[334], GC-MS[331,338,339,353], E[339], St[339]
31	α -pinene	80-56-108	136	TH; C; T; SP; E; G; M; WD; O; P; PL; K; S; A; CP; OG; CF; H; PS; OP; W; AB	GC-MS[162,163,167,184,188,303,327–331,339,344,346,353,354], St[327,339], GLC-MS[334,335], St[303,338,344]; GC[333]; IR[333], E[339]
32	β -pinene	127-91-3	136	TH; C; T; E; WD; O; P; K; A; OG; CP; CF; H; PS; OP; W	GC-MS[162,184,303,327–331,339,344,346], St[327,338,339,344], GLC-MS[334], E[339]
33	α -pinene-epoxide	1686-14-2	152	T	GLC-MS[334]
34	Trans-verbenol	1820-09-3	152	T; WD; AB	GLC-MS[334], GC-MS[339,344,353]
35	Cis-verbenol	1845-30-3	152	T; PL; S; OP	GLC-MS[334]; GC-MS[329,331]
36	verbenone	80-57-9	150	WD; A; CP; G; H; PS	GC-MS[184,303,329,339,344], St[339], E[339]
<i>Camphane and bornane monoterpenes</i>					
37	Camphene	79-92-5	136	T; E; A; CP; M; WD; OP	GLC-MS[334], GC-MS[162,188,303,329,339,346], St[338,339], E[339]

ANNEXES

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurrence	Identification
38	camphor	76-22-2	152	E; OP	GC-MS[162,329]
39	Borneol	507-70-0	154	O; OP	GC-MS[329,331]
40	Bornyl acetate	76-49-3	196	T; O ; OP ; W	GLC-MS[334,335]; GC-MS[329,331]
<i>Elemene sesquiterpenes</i>					
41	δ -elemene	20307-84-0	204	TH; M; PY; E; K; B; CF; H; PS; W	GC-MS[161–164,166,167,170,171,184,188,327,330,331,346–348,351,355–360]
42	α -elemene	5951-67-7	204	K; M	GC-MS[166,331,336]
43	γ -elemene	29873-99-2	204	M; PY; E;	GC-MS[161–164,167,170,171,188,336,346–349,351,355,356,359,361,362]
44	β -elemene	33880-83-0	204	TH; C; T; M; G; PY; H; SP; E; B; CF; H; PS; AB; K; W	GC-MS[161–164,167,170,171,184,188,327,330,346–348,351,352,356–358,361,363–366], GLC-MS[334]; APCI-MS[367], ¹³ C NMR[363,367]; ¹ H NMR[363,367]
45	β -elemenone	20303-60-0	218	E; M	GC-MS[161,346,352]
<i>Copaene sesquiterpenes</i>					
46	α -copaene	3856-25-5	204	T; M; PY; SP; H; E ; P; K; S; CF; H; PS; AB; OP; TH	GLC-MS[334], GC-MS[162–164,167,170,171,184,188,329–331,336,346,348,349,353–357,364,366,368]
47	β -copaene			M ; H ; E	GC-MS[163,184]
48	α -copaene-8-ol	1312700-12-1	222	M	GC-MS[362], St[362]
49	α -ylangene	14912-44-8	204	PY; P; S; CF; H; E; M; WD; OP; K	GC-MS[164,166,184,331,339,357,369]
<i>Oplopane sesquiterpenes</i>					
50	β -ylangene	20479-06-5	204	M; H; WD	GC-MS ¹⁻⁷ [167,170,339,348,360]
51	oplopanone	1911-78-0	238	G	LC-MS[370]
<i>Bergamotane sesquiterpenes</i>					
52	α -bergamotene	17699-05-7	204	G; CF; H; E; M; AB	GC-MS[170,184,188,341,350,353,355,366], ¹³ C NMR[189]; ¹ H NMR[189]
53	β -bergamotene	6895-56-3	204	G	GC-MS[170]
<i>Eremophilane sesquiterpenes</i>					
54	Valencene	4 630-07-3	204	M; AB	GC-MS[171,349,351,353]
55	4,5-di-epi-Aristolochene	54868-40-5	204	M	GC-MS[163]
<i>Bisabolane sesquiterpenes</i>					

ANNEXES

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurrence	Identification
56	α -bisabolene	17627-44-0	204	G; H; M	GC-MS[170,341,350], ¹³ C NMR[350]; ¹ H NMR[350], GC[371], IR[371], ¹³ C NMR[189]; ¹ H NMR[189]
57	β -bisabolene	4891-79-6/ 495-61-4	204	G; OP; E	GC-MS[329,341,350,352], GC[322,371], IR[322,371], St[341]
58	γ -bisabolene	495-62-5	204	G	GC-MS[341,359], GC[322,371], IR[322,371]
59	β -sesquiphellandrene	20307-83-9	204	M	GC-MS[161]
60	Ar-curcumene	644-30-4	202	E	¹ H NMR[324], IR[324]
61	xanthorrhizol	30199-26-9	218	K	GC-MS[328,356], ¹ H NMR[328], ¹³ C NMR ¹ , UV[328], IR[328]
<i>Guaiane sesquiterpenes</i>					
62	Alismol	87827-55-2	220	E; OP; M	¹ H NMR[346,372,373], ¹³ C NMR[372,373]
63	α -guaiene	3691-12-1	204	PY; SP; E; WD; M	GC-MS[162,164,167,336,339,346]
64	Guaia-6,10(15)-diene	1955531-26-6 / 847374-78-1	204	OP	HREIMS[374], ¹ H NMR[374], ¹³ C NMR[374]
65	4 α -methoxy-6-guaien-10 α -ol	331736-11-9	252	M	¹ H NMR[375], ¹³ C NMR[375]; HREIMS[375]
66	rel-(+)-(1S,4R,7S)-11-Acetyl-guai-10(14)-en-4,11-ol	unknown	280	M	¹ H NMR[376], ¹³ C NMR[376]; HRESIMS[376], UV[376]
67	rel-(+)-(4R,5R,7S)-11-Acetyl-guai-1(10)-en-4,11-ol	unknown	280	M	¹ H NMR[376], ¹³ C NMR[376]; HRESIMS[376], UV[376]
68	Commiphorane J	unknown	242	RC	¹ H NMR[377], ¹³ C NMR[377], UV[377], HRESIMS[377]
69	Myrrheterpenoid K	1422467-68-2	246	M	¹ H NMR[378], ¹³ C NMR[378][379][378], HRESIMS[378], IR[378][379][378]
70	gweicurculactone	123914-43-2	228	M	¹ H NMR[380], ¹³ C NMR[380], HRESIMS[380]
71	Myrrheterpenoid O	2604667-43-6	260	M	¹ H NMR[190,367], ¹³ C NMR[367], UV[190], IR[190]; GLC[190], APCI-MS[367]
72	Commiphorane O	unknown	279	RC	¹ H NMR[384], ¹³ C NMR[384], HRESIMS[384]
73	Myrrhanoperoxide	unknown	264	M	¹ H NMR[376], ¹³ C NMR[376]; HRESIMS[376], UV[376]
74	Myrrheterpenoid G	1392420-28-8	258	M	APCI-MS[367], ¹³ C NMR[367]; ¹ H NMR[367]
75	Myrrheterpenoid H	1392420-29-9	276	M	APCI-MS[367], ¹³ C NMR[367]; ¹ H NMR[367]
76	Myrrheterpenoid I	1392420-30-2	278	M	APCI-MS[367], ¹³ C NMR[367,385]; ¹ H NMR[367]

ANNEXES

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurrence	Identification
77	5β-10 α -hydroxy-2 α -methoxy-6-oxoguaia-7(11) ,8-dien-8,12-olide	1042109-87-4	292	OP	HREIMS[374,379], ¹ H NMR[374], ¹³ C NMR[374]
<i>Aromadendrane sesquiterpenes</i>					
78	Alloaromadendrene	25246-27-9	204	T; M; E; AB; K; TH; SP	GLC-MS[334], GC-MS[161–163,167,170,346,353,354,357,364,368]
79	β-gurjunene	73464-47-8	204	T; K; W; M	GLC-MS[334], GC-MS[330,349,357]
80	α-gurjunene	489-40-7	204	SP; E; AB; W	GC-MS[162,167,303,330,346,352,364]
81	Ledene	21747-46-6	204	S; OP	GC-MS[331,338,369,386][338]
82	spathulenol	6750-60-3	220	M; PY; B; H; E; PS; WD	GC-MS[164,184,343,352,356]
83	Aromadendrene	489-39-4	204	TH; PY; E; M; K; OP; W	GC-MS[162,164,327,329–331,346,351,354,355]
84	dehydroaromadendrene	698388-95-3	202	M; B; CF; H; E; PS; M; PY	GC-MS[161,184]
85	α-humulene	6753-98-6	204	TH; M; H; E; O; AB; W; SP	GC-MS[161–163,166,167,170,171,184,188,327,330,331,336,346,347,349,351,353–356,364,368]
<i>Cadinane, muurolane and amorphane sesquiterpenes</i>					
86	α-cadinene	24406-05-1	204	E; M; W	GC-MS[162,330,346,351]
87	γ-muurolene	30021-74-0	204	M; PY; H; SP	GC-MS[161,163,164,166,167,170,171,351,366,368]
88	δ-cadinene	483-76-1	204	TH; T; G; M; SP; H; E; P; K; OP; W; AB; W	GC-MS[161–163,166,167,170,171,327,329–331,346–348,353–356,362,368], GLC-MS[334,335]
89	γ-cadinene	39029-41-9	204	M; SP; E; P; K; S; OP; W; AB	GC-MS[161–163,166,167,170,188,329–331,346,348,349,353,356,357,361]
90	Muurola-3,5-diene	157374-44-2/262352-88-5		M; CF; H	GC-MS[163,184]
91	3-oxo-T-cadinol	53402-16-7	236	G	¹ H NMR[370], ¹³ C NMR[370],
92	11-hydroxy-γ-muurolene	1651826-26-4	220	H	¹³ C NMR[366]; ¹ H NMR[366], GC-MS[366]
93	Calamenene	483-77-2	202	H; E; M; OP; M	GC-MS[184,348,386]
94	Muurola-4(14)5-diene	262352-87-4	204	M	GC-MS[163]
95	α-muurolene	10208-80-7	204	TH; T; M; O; P; AB; K; W	GC-MS[163,327,330,331,336,357,364], GLC-MS[334]
96	α-amorphene	20085-19-2	204	P; K; PY; W; SP	GC-MS[164,330,331,351,368]
97	α-cadinol	481-34-5	222	PL; K; S; AB; TH; W	GC-MS[330,331,353,354,357,364]
98	δ-cadinol	19435-97-3	222	M	GC-MS[351]

ANNEXES

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurence	Identification
99	(+)-T-cadinol	5937-11-1	222	G; M; PY; SP; K;	LC-MS[370], GC-MS[163,164,166,167,170,188,351,363,387,388], APCI-MS[389], ¹ H NMR[363,387,389], ¹³ C NMR[363,387,389], IR[387]
100	Cadina-1(6),4-diene	1187195-00-1	204	M; AB; E	GC-MS[163,352,364]
101	commipholinone	1363258-71-2	232	M; OP	¹ H NMR[381–383], ¹³ C NMR[381–383], HRESIMS[381–383], UV[383], IR[383]
102	Myrracadinol A (cadina-3-en-15-ol)	913262-61-0	222	M	GC-MS[390], ¹ H NMR[390,391], ¹³ C NMR[390,391], IR[390], ESI-MS[391]
103	8-hydroxy-12-norcadina-4,6,8,10-tetraen-11-one	2641879-51-6	217	RC	¹ H NMR[392], ¹³ C NMR[392], HREIMS[392],
104	Myrracalamene C (7,8-seco-12-hydroxycalam-8-ene)	913262-65-4	218	M	¹ H NMR[390], ¹³ C NMR[390], IR[390], FAB-MS[390]
105	Commiterpene A	1392202-41-3	253	M	¹ H NMR[382,385], ¹³ C NMR[382,385], HRESIMS[382,385], IR[382,385]
106	Commiterpene B	1392205-20-7	302	M	¹ H NMR[385], ¹³ C NMR[385], HRESIMS[385], IR[385]
107	Commiterpene C	1392476-49-1	276	M	¹ H NMR[385], ¹³ C NMR[385], HRESIMS[385], IR[385]
108	Commiterpene D	unknown	340	M	¹ H NMR[376], ¹³ C NMR[376]; HRESIMS[376], UV[376]
109	Myrrhaterpenoid J	1392420-31-3	260	M	¹ H NMR[379], ¹³ C NMR[379], HRESIMS[379], IR[379], UV[379]
110	myrrhone	183551-83-9	228	E; OP; M	St[346], ¹ H NMR[346,367,372,375,381,389,393–397], ¹³ C NMR[367,372,375,381,389,393–397]; HREIMS[372,375,381,393], APCI-MS[367,389], FT-IR[397], GC-MS[346], ESI-MS[396]
111	Myrrhanolide B	1147340-33-7	262	OP; M	¹ H NMR[372,375], ¹³ C NMR[372,375]; HREIMS[372,375]
112	Myrrhanolide C	1147340-35-9	262	OP; M	¹ H NMR[372,375,381], ¹³ C NMR[372,375,381]; HREIMS[372,375,381]
113	furanocadina-1(10),6,8-triene-4-ol	1042109-89-6	230	OP	HREIMS[374], ¹ H NMR[374], ¹³ C NMR[374]
114	(11 β)-8,11-dihydroxycadina-6,8,10-trien-12-oic acid γ -lactone	unknown		M	¹ H NMR[377], ¹³ C NMR[377], UV[377], HRESIMS[377]
115	Commiphoin B		213	M	¹ H NMR[382], ¹³ C NMR[382], HRESIMS[382]
116	Commiphoin C		245	M	¹ H NMR[382], ¹³ C NMR[382], HRESIMS[382]
117	9-methoxymyrrhone	1809980-22-0	258	OP	HRMS[372], ¹ H NMR[372], ¹³ C NMR[372]
118	Commiphorane H		242	RC	¹ H NMR[377], ¹³ C NMR[377], UV[377], HRESIMS[377]
119	Commipholactam A		242	RC	¹ H NMR[377], ¹³ C NMR[377], UV[377], HRESIMS[377]
120	Commiphorene A		300	RC	¹ H NMR[381], ¹³ C NMR[381], HRESIMS[381]
121	Commiphorene B		244	RC	¹ H NMR[381], ¹³ C NMR[381], HRESIMS[381]

ANNEXES

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurrence	Identification
122	Dihydropyrocurzerenone	59462-26-9	214	SP; E; OP; M	HRGCMS[167], IR[167], ¹ H NMR[162,167,190,393][373], ¹³ C NMR[167,346][373]; St[346]; UV[190], GLC[190], ESI-MS[372], GC-MS[373]
123	agarsenone	1447457-27-3	220	OP; E	HRMS[372], ¹ H NMR[372,394,397], ¹³ C NMR[372,394,397], ESI-MS[372]
<i>Eudesmane sesquiterpenes</i>					
124	β-selinene	17066-67-0	204	M; T; SP; H; E; H; TH; W; AB	GC-MS[162,163,167,170,330,343,346–348,353–355], GLC-MS[334]
125	α-selinene	473-13-2	204	T; M; SP; E; AB; TH; W	GLC-MS[334]; GC-MS[162,163,167,170,330,346,347,354,364]
126	Selina-3,7(11)-diene	6813-21-4	204	M; W	GC-MS[161,163,330]
127	Selina-4,11-diene	17627-30-4	204	M	GC-MS[347]
128	11-Hydroxy-4 α -methoxyselinane	95360-09-1	254	OP	¹ H NMR[383], ¹³ C NMR[383], HRESIMS[383], UV[383], IR[383]
129	Commiphorane I		242	RC	¹ H NMR[377], ¹³ C NMR[377], UV[377], HRESIMS[377]
130	β-eudesmol	473-15-4	222	E; PL; S; OP	GC-MS[162,167,329,331,346,352,358]
131	α-eudesmol	473-16-5	222	E; P; PL; K; S; H;	GC-MS[162,184,331,346,346,352,358]
132	γ -eudesmol	1209-71-8	222	M	GC-MS[161,166,356]
133	7-epi-α-eudesmol	123123-38-6	222	M	GC-MS[161,348,359]
134	β -eudesmol acetate	40882-95-9	264	M	GC-MS[171,342], ¹ H NMR[342], [α] _D [342], IR[342]
135	1 β ,4 β -Epoxyeudesman-11-ol	1361531-71-6	238	OP	¹ H NMR[383], ¹³ C NMR[383], HRESIMS[383], UV[383], IR[383]
136	Furanoeudesma-1,3-diene	115526-32-4 /87605-93-4	214	M	HRGCMS[398], ¹³ C NMR; ¹ H NMR[168,169,190,398]; GC-MS[161,163,168–171,188,190,347–349,351,355,356,361,362,399–401], IR[169], St[356], UV[190], GLC[190]
137	Myrrhaterpenoid M	1422035-27-5	278	M	¹ H NMR[378], ¹³ C NMR[378][379][378] , HRESIMS[378], IR[378][379][378]
138	eudesma-1,3,7(11)-trien-8,12-olide	176656-47-6	230	M	HRGCMS[398], ¹³ C NMR[398]; ¹ H NMR[398]
139	Lindestrene	2221-88-7	214	M; AB;	GC-MS[163,167,168,170,171,190,347–349,351,355,356,361,362,402], IR[190,402], ¹ H NMR[168,190,402], ¹³ C NMR[169], GLC[190]
140	Myrrhaterpenoid N	1422467-70-6	246	M	¹ H NMR[378], ¹³ C NMR[378][379][378] , HRESIMS[378], IR[378][379][378]
141	9-Nor-9,10-seco-isolindestrenolide	unknown	216	M	¹ H NMR[376], ¹³ C NMR[376]; HRESIMS[376], UV[376]

ANNEXES

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurence	Identification
142	Myrrhanolide A	1147340-31-5	244	M	¹ H NMR[375], ¹³ C NMR[375]; HREIMS[375]
143	hydroxylindestrenolide	20267-92-9	246	M	¹ H NMR[367,375,376], ¹³ C NMR[367,375,376]; HREIMS[367,375,376], APCI-MS[367], UV[376]
144	Furanoeudesma-1,4-diene-6-one	87605-94-5	228	M	GC-MS[169,362], IR[169], ¹ H NMR[169], ¹³ C NMR[169]
145	Furanoeudesma-1,4-diene	631868-96-7	214	M	GC-MS[167,170,347,355]
146	3,8a-Dimethyl-5-methylene-4,4a,5,6,8a,9-hexahydro-naphtho[2,3-b]furan	4857-12-9	214	M; H	UV[401], IR[401], ¹ H-NMR[401], ¹³ C-NMR[401], GC-MS[401]
147	commiferin	39007-92-6	248	M	TS[403]
148	lindestrenolide	unknown	230	M	¹ H NMR[376], ¹³ C NMR[376]; HRESIMS[376], UV[376]
149	atractylenolide	unknown	248	M	¹ H NMR[376], ¹³ C NMR[376]; HRESIMS[376], UV[376]
150	atractylone	6989-21-5	216	M	GC-MS[163,171,347,359]
151	Myrrheterpenoid A	1392420-23-3	246	M	¹ H NMR[379], ¹³ C NMR[379], HRESIMS[379], IR[379], UV[379]
152	isohydroxylindestrenolide	unknown	246	M	¹ H NMR[376], ¹³ C NMR[376]; HRESIMS[376], UV[376]
153	Commiphorane E2	2247437-27-8	260	RC	¹ H NMR[404], ¹³ C NMR[404], HRESIMS[404]
154	Commiphorane E3	2231045-14-8	242	RC	¹ H NMR[376,404], ¹³ C NMR[376,404], HRESIMS[376,404], UV[376]
155	9,10-Seco-isohydroxylindestrenolide	Unknown	246	M	¹ H NMR[376], ¹³ C NMR[376]; HRESIMS[376], UV[376]
156	4 β -Hydroxy-8,12-epoxyeudesma-7,11-diene-1,6-dione	1079243-68-7	262	M	¹ H NMR[376,379], ¹³ C NMR[376]; HRESIMS[376], UV[376]
<i>Elemene sesquiterpenes</i>					
157	γ -elemene lactone	1919028-92-4	230	M	HRGCMS[398], ¹³ C NMR[398]; ¹ H NMR[398]
158	Isofuranogermacrene (curzerene)	17910-09-7	216	M; AB; G; E; CF; H; WD	GC-MS[161–163,166–168,171,184,188,190,306,336,339,341,343,346–348,351,352,355,356,361,362,400,402], IR[190,402], ¹ H NMR[190,304,402], UV[190], GLC[190]
159	8-hydroxyisogermafurenolide	20267-91-8	248	M	APCI-MS[367], ¹³ C NMR[367,376]; ¹ H NMR[367,376], HRESIMS[375,376], UV[376]
160	isogermafurenolide	20267-89-4	232	M	¹ H NMR[376], ¹³ C NMR[376]; HRESIMS[376], UV[376]
161	2-methoxyisogermafurenolide	2604667-38-9	262	M	APCI-MS[367], ¹³ C NMR[367,376]; ¹ H NMR[367,376], HRESIMS[376], UV[376]

ANNEXES

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurrence	Identification
162	8-epi-2-methoxyisogermafurenolide	2604667-39-0	262	M	APCI-MS[367], ¹³ C NMR[367,376]; ¹ H NMR[367,376], HRESIMS[376], UV[376]
163	curzerenone	20493-56-5	230	AB; SP; H; E; M; B; CF; PS; OP; W	GC-MS[167,171,184,190,346,358,373,375,400,402], HRGCMS[167], IR[167,402], ¹ H NMR[162,167,190,367,373,375,385,393,402,405], ¹³ C NMR[167,190,367,373,375,375,393,405]; HREIMS[375,393]; APCI-MS[367,405], UV[190], GLC[190]
164	epicurzerenone	20085-85-2	230	M	GC-MS[355,362,389]; APCI-MS[389], ¹ H NMR[389], ¹³ C NMR[389]
165	elemol	639-99-6	222	M; PY; PL; S; E	GC-MS[161,164,166,167,170,171,331,347,348,351,352,355,356,358]
166	Elemol acetate	60031-93-8	264	M	GC-MS[188], APCI-MS[367], ¹³ C NMR[367]; ¹ H NMR[367]
167	Isoserinenine	274675-52-4	258	M	GC-MS[343,351,356]
<i>Caryophyllane sesquiterpenes</i>					
168	β-caryophyllene	87-44-5	204	TH; C; T; M; G; OP; SP; O; K; S; E; H; PS; W; AB	GC-MS[161–163,166,167,170,171,184,188,327,329–331,336,341,346,347,351,353,361,365,368]· St[327], GLC-MS[334]
169	Caryophyllene oxide	1139-30-6	220	M; O; P; PL; S; G; E; AB; TH; W; SP	GC-MS[161,184,330,331,343,348,351,353,354,356,364,368]
<i>Other sesquiterpenoids</i>					
170	α-Campholenal	4501-58-0	152	T; OP	GLC-MS[334], GC-MS[329]
171	calarene	17334-55-3	204	K; H; M	GC-MS[331,360]
172	Longipinene	5989-08-2	204	TH; PY	GC-MS[164,327]
173	β-cubebene	13744-15-5	204	TH; C; M; W	GC-MS[327,349,351,354,386],
174	cyclosativene	22469-52-9	204	W	GC-MS[330]
175	Commiphoranoid A	unknown	246	RC	¹ H NMR[406], ¹³ C NMR[406], HRESIMS[406]
176	Commiphoranoid B	unknown	228	RC	¹ H NMR[406], ¹³ C NMR[406], HRESIMS[406]
177	Commiphoranoid C	unknown	318	RC	¹ H NMR[406], ¹³ C NMR[406], HRESIMS[406]
178	Commiphorane C	2073948-99-7	304	RC	¹ H NMR[407], ¹³ C NMR[407], HRESIMS[407]
179	Commiphorane D	2073949-00-3	304	RC	¹ H NMR[407], ¹³ C NMR[407], HRESIMS[407]
180	Commiphorane L	unknown	291	RC	¹ H NMR[384], ¹³ C NMR[384], HRESIMS[384]
181	methoxyfuranoguaia-9-ene-8-one	88010-62-2	262	M	¹ H NMR[325,400], ¹³ C NMR[325], GC-MS[362,400]
182	Myrrhaterpenoid O	unknown	261	mix	¹ H NMR, ¹³ C NMR[367]

Camphene sesquiterpenes

ANNEXES

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurrence	Identification
183	Epi- β -santalene	37876-51-0	204	G	GC-MS[170,350]
184	β -santalene	511-51-9	204	G	GC-MS[170,350]
185	α -santalene	512-61-8	204	G; B; CF; H; E; M	GC-MS[170,341,350,352], ^{13}C NMR[350]; ^1H NMR[350], GC[322,371], IR[322,371]
186	(E)- α -Santalal	19903-70-9	218	G; M	GC-MS[170], ^{13}C NMR[189]; ^1H NMR[189]
187	photosantalol	63569-03-9	220	M	^{13}C NMR[189]; ^1H NMR[189]
188	Campherenol	18530-03-5	222	M	^{13}C NMR[189]; ^1H NMR[189]
<i>Germa crane sesquiterpenes</i>					
189	germacrone	6902-91-6	218	SP; H; E; M;	GC-MS[162,163,166,167,171,188,336,346,347,349,361]
190	Germa crene B	15423-57-1	204	M; E; AB; W; K; H; SP	GC-MS[162,163,167,170,171,330,343,347–349,355,359,361,364,408]
191	Germa crene D	23986-74-5	204	M; G; PY; H; E; K; B; CF; H; W	GC-MS[162–164,166,167,170,171,184,188,330,331,336,346–349,355,356,360,365]
192	Germa crene A	28387-44-2		M	GC-MS[163,171]
193	hedycaryol	21657-90-9	222	M; H; E	GC-MS[163,184]
194	bicyclo germa crene	24703-35-3	204	M; H	GC-MS[167,170,360]
195	Myrrh terpenoid B	1392420-24-4	246	M	^1H NMR[379], ^{13}C NMR[379], HRESIMS[379], IR[379], UV[379]
196	Myrrh terpenoid C	1392420-25-5	278	M	^1H NMR[379], ^{13}C NMR[379], HRESIMS[379], IR[379], UV[379]
197	Myrrh terpenoid D	1392420-26-6	336	M	^1H NMR[379], ^{13}C NMR[379], HRESIMS[379], IR[379], UV[379]
198	Myrrh terpenoid E	1384099-92-6	276	M	^1H NMR[379], ^{13}C NMR[379], HRESIMS[379], IR[379], UV[379]
199	Myrrh terpenoid F	1392420-27-7	288	M	^1H NMR[379], ^{13}C NMR[379], HRESIMS[379], IR[379], UV[379]
200	rel-2R-methyl-5S-acetoxy-4R-furanogerma cr-1(10)Z-en-6-one	383368-25-0	320	M	APCI-MS[405], ^{13}C NMR[303,405], ^1H NMR[405]
201	2-Methoxy-5-acetox yfuranogerma cr-1(10)-en-6-one	75412-96-3	320	H; OP; M	^{13}C NMR[326,367,373,375,393,401,409,410,410,411]; ^1H NMR[326,367,373,375,393,396,401,409–412], IR[326,401], UV[401], GC-MS[373,401], HREIMS[375,393,396,410], APCI-MS[367], St[413]
202	4,5-dihydrofuranodien-6-one	88010-65-5/115526-31-3 (Z)	232	M; H	^1H NMR[325], ^{13}C NMR[325], GC-MS[362,401]

ANNEXES

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurence	Identification
203	2-methoxyfuranodiene (2-O-methyl-8,12-epoxygermacra-1(10),4,7,11-tetraene), (-2-methoxy-furanogermacra-1(10),4-diene)	82901-10-8 (S,E,E)/ 108376-98-3 (R,E,E)/ 82901-10-8	246	M; K; E	HRGCMS[398], ¹³ C NMR[325,367,398]; ¹ H NMR[180,325,367,398], GC-MS[161,167,170,180,328,347,355,359,362,400], IR[180], APCI-MS[367]
204	1(10)E,4E-Furanodiene [cyclodeca[b]furan,4,7,8,11-tetrahydro-3,6,10-trimethyl-, (5E,9Z)-]	19912-61-9	216	M; G; AB; G; SP	HRGCMS[398], ¹³ C NMR[167,350,391,398]; ¹ H NMR[167,168,391,414], GC-MS[161,166–168,170,348–350,362,400,402], HREIMS[393], IR[414], EIMS[414], ESI-MS[391]
205	2-acetoxifyfuranodiene (2-O-acetyl-8,12-epoxygermacra-1(10),4,7,11-tetraene)	82901-09-5/ 1919035-48-5	274	M; K; SP	HRGCMS[398], ¹³ C NMR[325,391,398,415]; ¹ H NMR[180,391,398,414,415], GC-MS[161,167,180,328,348,355,362,362,400,415], IR[180,416], LC-MS[415], EIMS[414] ESI-MS[391]
206	Methoxy-4S-furanogermacra-1E,10(15)-dien-6-one	75412-97-4 (rel confi N.C.)	260	H; M; E	¹³ C NMR[190,326,394,395,401,405,417]; IR[190,326,401], GC-MS[401], UV[190,401], GLC[190], St[346], ¹ H NMR[162,187,190,326,346,394,395,401,405,417], APCI-MS[405]
207	(1E)-3-Methoxy-8,12-epoxygermacra-1,7R,10,11-tetraen-6S-one	1393342-06-7	260	M; OP; E	¹³ C NMR[187,372,418], ¹ H NMR[187,372,418]
208	(1E)-3-Methoxy-8,12-epoxygermacra-1,7S,10,11-tetraen-6R-one	383368-26-1 (rel conf R/S)	260	SP; H; OP; M; E	HRGCMS[167], IR[167], ¹ H NMR[162,167,346,346,366,373–375,394,396,405], ¹³ C NMR[167,346,366,373–375,395,396], HREIMS[375,396], UV[394], ECD[394], APCI-MS[405], GC-MS[366]
209	1,2-epoxyfurano-10(15)-germacren-6-one	383368-24-9/ 2604667-37-8	246	H; OP; M; E	¹³ C NMR ^{42,102,122–124,1,134,136,153} ; ¹ H NMR[367,372–375,394,405,417], MS[373,375,417], IR[417], APCI-MS[367,405], ESI-MS[372]
210	(1E,4E)-8,12-Epoxygermacra-1(10),4,7,11-tetraen-6-one (furanodienone)	24268-41-5 (E)	230	AB; SP; H; E; M	GC-MS[167,180,187,356,358,373,400,402], IR[167,402], ¹ H NMR[167,180,187,190,346,367,400,402] HRGCMS[167], ¹³ C NMR[167,367], XRC, St[346,356], UV[190], GLC[190], APCI-MS[367], GC-MS[325,362,373], ¹ H NMR[162,190,325,367,373,391,395], ¹³ C NMR[190,325,367,373,391], APCI-MS[367,405], ESI-MS[391]
211	1(10),4-furanodien-6-one (=furanodien-6-one)	88010-63-3 (Z)/ 1361454-70-7(N.C.)	230	E; M	
212	1, 10(15)-Furanogermacra-dien-6-one ((1E)-8,12-Epoxygermacra-1,7,10,11-tetraen-6-one)	1361453-55-5/ 1402946-77-3 (S)	230	E (conf abs. S); M; SP; H	¹ H NMR[162,167,187,346,346,373,389,394,395], ¹³ C NMR[167,373,389,394], APCI-MS[389], GC-MS[187,373], ECD[394], GLC[190]

ANNEXES

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurence	Identification
213	rel-(1S,2S,3R,4S)-1,2-Epoxy-3-methoxyfuranogermacr-10(15)-en-6-one	1809980-23-1	276	OP	HRMS[372], ¹ H NMR[372], ¹³ C NMR[372]
214	Myrrhasin A	1618111-87-7	306	OP	¹ H NMR[396], ¹³ C NMR[396]; HRESIMS[396]
215	2 α -methoxy-6-oxogermacr-1(10),7(11)-dien-8,12-olide	1042109-84-1	278	OP	HREIMS[374,379], ¹ H NMR[374], ¹³ C NMR[374],
216	2-hydroxyfuranodiene	1919029-36-9		M	HRGCMS[398], ¹³ C NMR[398]; ¹ H NMR[398]; GC-MS[161,355]
217	2-hydroxy-11,12-dihydrofuranodiene	1928723-17-4	234	M	HRGCMS[398], ¹³ C NMR[398]; ¹ H NMR[398]
218	2 α -Methoxy-8 α -hydroxy-6-oxogermacr-1(10),7(11)-dien 8,12-olide	1361531-69-2	294	OP	¹ H NMR[383,409], ¹³ C NMR[372,383], HRESIMS[383], UV[383], IR[383]
219	2-acetyloxyglechomanolide	unknown	291	M	APCI-MS[367], ¹³ C NMR[367]; ¹ H NMR[367]
220	8-epi-2-acetyloxyglechomanolide	unknown	291	M	APCI-MS[367], ¹³ C NMR[367]; ¹ H NMR[367]
221	Commiphorane M	unknown	347	RC	¹ H NMR[384], ¹³ C NMR[384], HRESIMS[384]
222	Commiphorane N	unknown	345	RC	¹ H NMR[384], ¹³ C NMR[384], HRESIMS[384]
223	1 β ,8 β -Epoxy-2 α -methoxy-6-oxogermacr-9(10),7(11)-dien 8,12-olide	1361531-66-9	292	OP	¹ H NMR[383], ¹³ C NMR[383], HRESIMS[383], UV[383], IR[383]
224	1 β ,8 β -Epoxy-2 α -methoxy-12 α -hydroxy-6-oxogermacr-9(10),7(11)-dien 8,12-olide	1361531-67-0	294	OP	¹ H NMR[383], ¹³ C NMR[383], HRESIMS[383], UV[383], IR[383]
225	1 β ,8 β -Epoxy-2 α -methoxy-12 β -hydroxy-6-oxogermacr-9(10),7(11)-dien 8,12-olide	1361531-68-1	294	OP	¹ H NMR[383], ¹³ C NMR[383], HRESIMS[383], UV[383], IR[383]

ANNEXES

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurence	Identification
226	(1(10)E,2R*,4R*)-2-methoxy-8,12-epoxygermacra-1(10),7,11-trien-6-one (=2-methoxy-4,5-dihydrofuranodien-6-one)	75412-95-2 abs conf R / 2604667-36-7	262	H; SP; E; OP; M	¹³ C NMR[167,187,326,346,366,367,372,373,375,393,395,401,411]; ¹ H NMR[167,187,190,326,346,366,367,372,373,375,393,395,401,411,412], IR[167,326,401] HRGCMS[167]; GC-MS[167,187,359,366,373,401,419], UV[190,401]; HREIMS[393]; GLC[190], APCI-MS[367], St[413]
227	2-methoxy-furanogermacren-6-one (methoxy-4R-furanogermacra-1(10)E-en-6-one	383368-27-2 abs conf S /(1049129-98-7*)	262	E; M	St[346], ¹ H NMR[162,394,405], ¹³ C NMR[394,405], APCI-MS[405]
228	Myrrhanolide D	1618111-86-6	350	OP	¹ H NMR[396], ¹³ C NMR[396]; HRESIMS[396]
Acyclic sesquiterpenes					
229	α -farnesene	502-61-4	204	M; G; H;	GC-MS[184,365]
230	β -farnesene	502-99-8	136	G; M; P	GC-MS[163,331,341,350,420][338]
phenylpropanoid					
231	eugenol	97-53-0	164	M; W	GC-MS[362], GLC[335]
benzaldehyde					
232	Cuminaldehyde	122-03-2	148	M	GC-MS[362]
Miscellaneous compound					
233	Styrene	100-42-5	104	OP; AB	GC-MS[329,338,421][338]
234	n-heptane	142-82-5	100	WD	GC-MS[339]
Cembrene diterpenes					
235	Cembrene A	31570-39-5	272	W; M	GC-MS[173,330,348], ¹ H NMR[173,422], IR[173], ¹³ C NMR[422]
236	Cembrene	1898-13-1	272	W; WD	¹ H NMR[422,423], ¹³ C NMR[422], GC-MS[330,339]
237	Cembrenol	67921-02-2	290	W	¹ H NMR[422], ¹³ C NMR[422]
238	isocembrol	25269-17-4	290	W	¹ H NMR[173,177,183,424], GC-MS[330]
239	4-epi-isocembrol	80126-41-6	290	W	¹ H NMR[425]
240	Mukulol (allylcembrol)	41943-03-7/39012-00-5	290	W	GC-MS[173], ¹ H NMR[173,177,183,422,423], IR[173,423], ¹³ C NMR[422,423]

ANNEXES

n°	Name/Structure	CAS RN	MW	Occurence	Identification
<i>Abietane diterpenes</i>					
241	7-Oxocallitrisic acid	155473-19-1	314	RC	¹ H NMR[404], ¹³ C NMR[404],
242	7-Oxo-13 β -methoxyabiet-8(14)-en-18-oic acid	262356-01-4	348	RC	¹ H NMR[404], ¹³ C NMR[404]
243	7-Oxo-13 α -methoxyabiet-8(14)-en-18-oic acid	Inconnu	348	RC	¹ H NMR[404], ¹³ C NMR[404]
244	19-Norabieta-5,8,11,13-tetraen-7-one	22566-15-0	268	M	¹ H NMR[404], ¹³ C NMR[404], HRESIMS[404]
245	Dehydroabietic acid	1740-19-8	300	M	¹ H NMR[404,410,426], ¹³ C NMR[404,410,426], HRMS[410,426], UV[404], IR[426]
246	Abietic acid	514-10-3	302	M	¹ H NMR[410], ¹³ C NMR[410], HRESIMS[410]
247	Abieta-8,11,13,15-tetraen-18-oic acid	82276-84-4	298	M	¹ H NMR[404], ¹³ C NMR[404],
248	Commiphorane K1		242	RC	¹ H NMR[377], ¹³ C NMR[377], UV[377], HRESIMS[377]
249	Commiphorane K2		242	RC	¹ H NMR[377], ¹³ C NMR[377], UV[377], HRESIMS[377]
<i>Pimarane and podocarpene diterpenes</i>					
250	Pimaric acid	127-27-5	302	RC	¹ H NMR[404], ¹³ C NMR[404], UV[404]
251	Pimarol	1686-59-5	288	RC	¹ H NMR[404], ¹³ C NMR[404], UV[404]
252	Sandaracopimaric acid	471-74-9	302	M	¹ H NMR[410,426], ¹³ C NMR[410,426], HRESIMS[410,426], IR[426]
253	Commiphorane F	2187408-94-0	274	RC	¹ H NMR[404], ¹³ C NMR[404], HRESIMS[404]
254	Podocarpene-13-on-18-oic acid	63976-69-2	276	RC	¹ H NMR[404], ¹³ C NMR[404],
<i>Verticillane and camphorane diterpenes</i>					
255	Verticillol	70000-19-0	290	W	¹ H NMR[422], ¹³ C NMR[422]
256	camphorene	20016-72-2	272	W	IR[423], S[423]
<i>dinorterpeneoids</i>					
257	Commiphorane A	2073116-18-2	316	RC	¹ H NMR[407], ¹³ C NMR[407], HRESIMS[407]
258	Commiphorane B	2073948-98-6	316	RC	¹ H NMR[407], ¹³ C NMR[407], HRESIMS[407]
259	Commiphorane K	unknown	357	RC	¹ H NMR[384], ¹³ C NMR[384], HRESIMS[384]
260	Myrrhanone C (homonym)	unknown	294	W	¹³ C NMR[427,428]; ¹ H NMR[427,428], IR[427,428], ESIMS[427,428]

ANNEXES

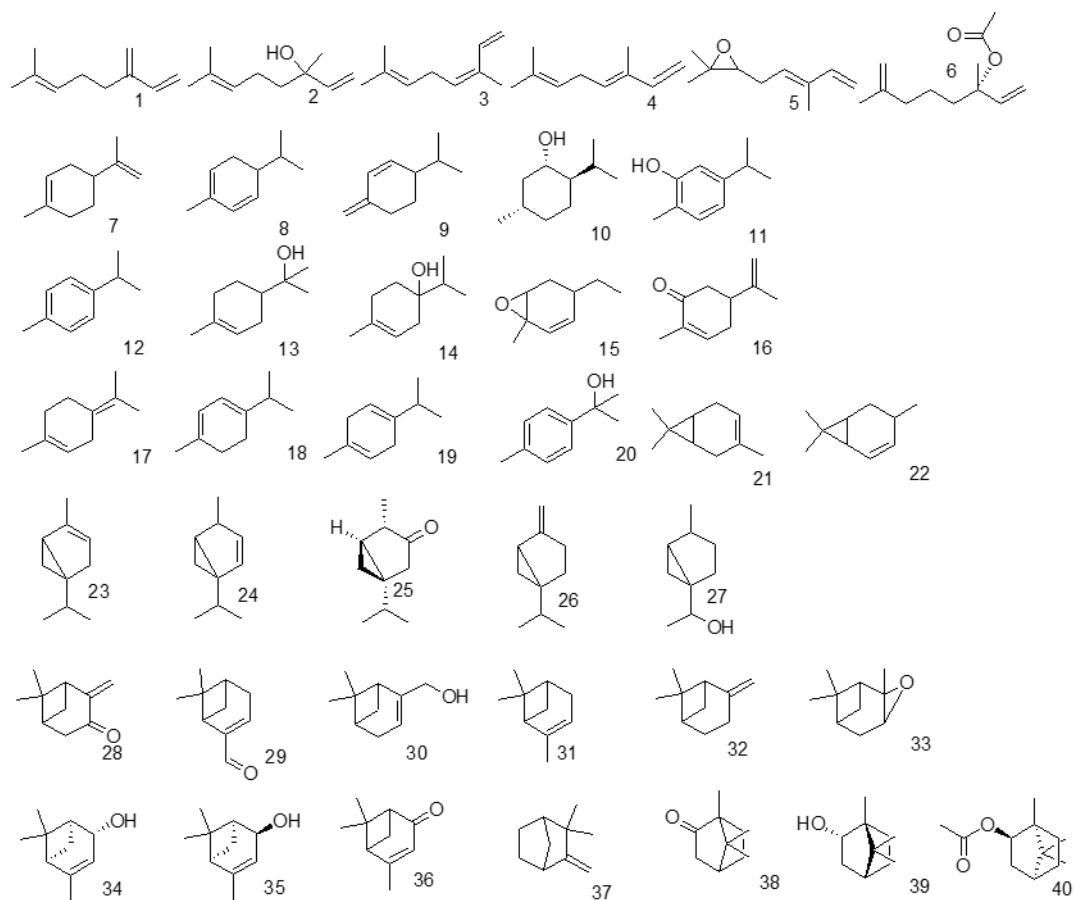
¹ M, *C. myrrha*; W, *C. mukul*; E, *C. erythrea*; K, *C. kua*; T, *C. tenuis*; TH, *C. terebinthina*; C, *C. cyclophylla*; O, *C. ornifolia*; P, *C. parviflora*; S, *C. socotrana*; G, *C. guidotti*; CP, *C. campestris*; A, *C. africana*; OG, *C. ogadensis*; AB, *C. habessinica*; H, *C. holtziana*; PY, *C. pyracanthoides*; SP, *C. sphaerocarpa*; WD, *C. wildii*; PL, *C. planifrons*; CF, *C. confusa*; PP, *C. pseudopaolii*; B, *C. baluensis*; OP, *C. opobalsamum*; I, *C. incisa*; RC, *Resina Commiphora = unknown myrrh species*

¹ Identification mode: S, synthesis, chemical transformations of related substances; TS, total synthesis; St, comparison with standard compound. XRC, X-ray crystallography; E, enantioselective GC analysis

¹ CAS number corresponding to an undefined absolute configuration. CAS, Chemical Abstracts Service; RN registry number; MW, molecular weight.

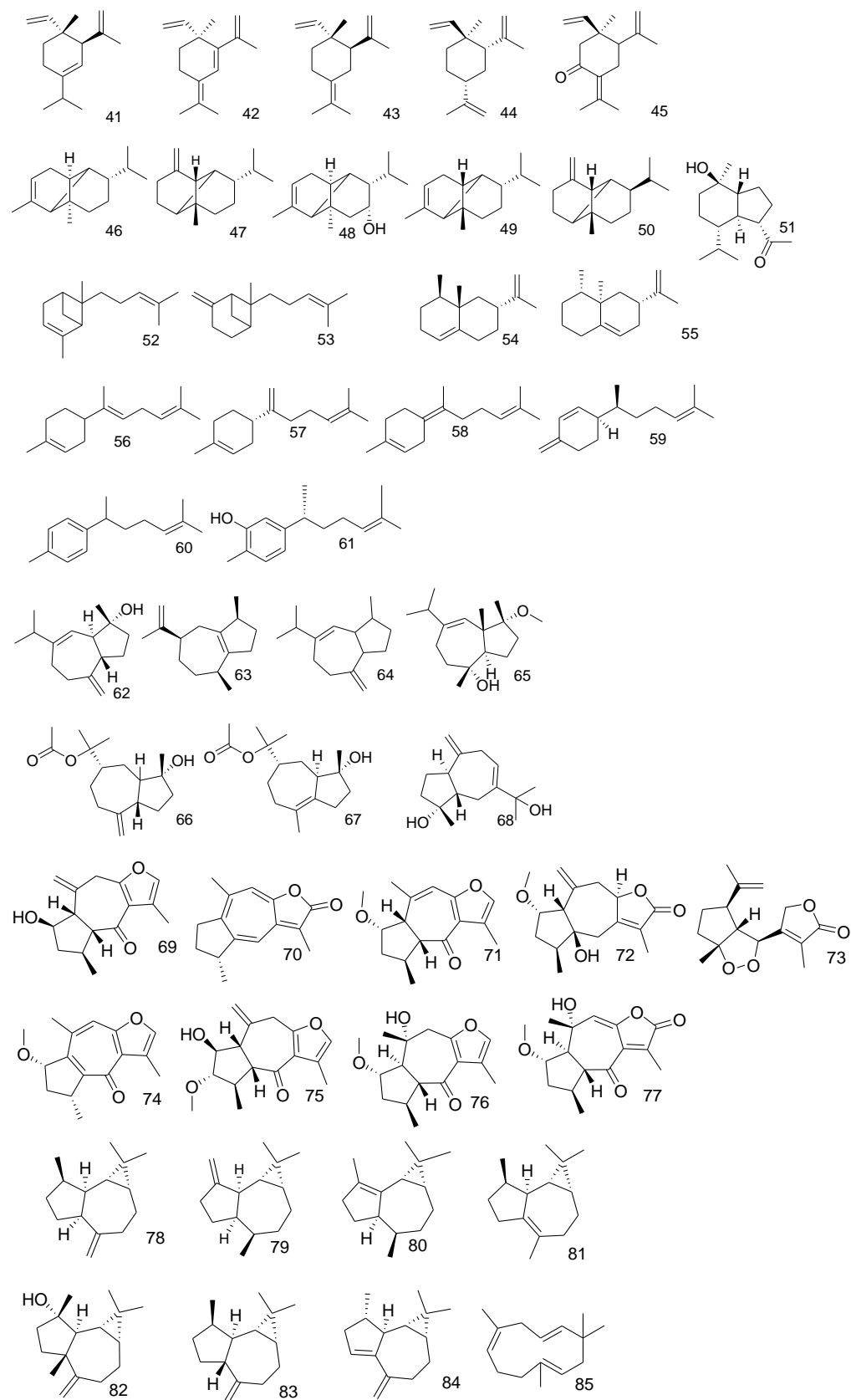
ANNEXES

1. Monoterpenic compounds structures

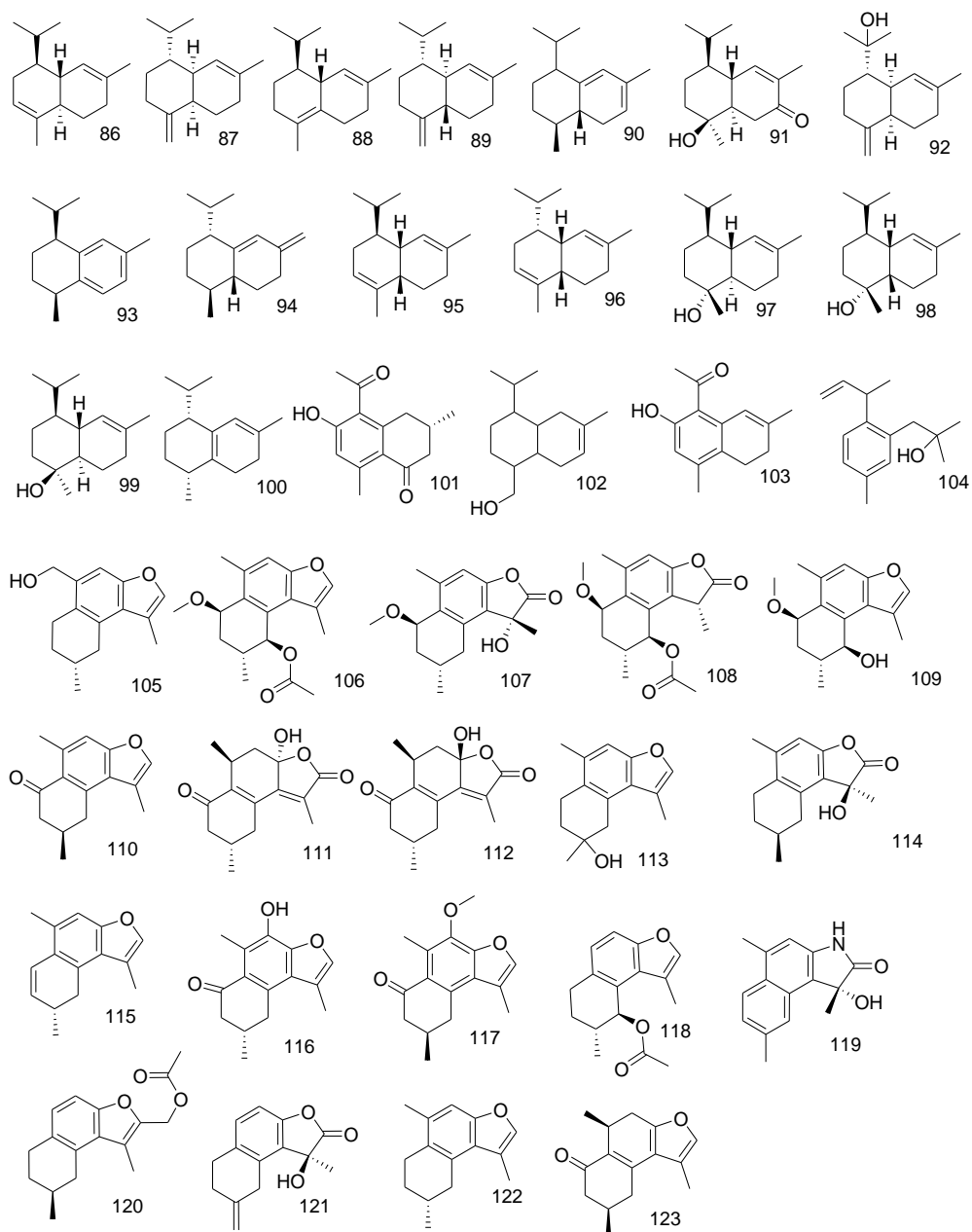


ANNEXES

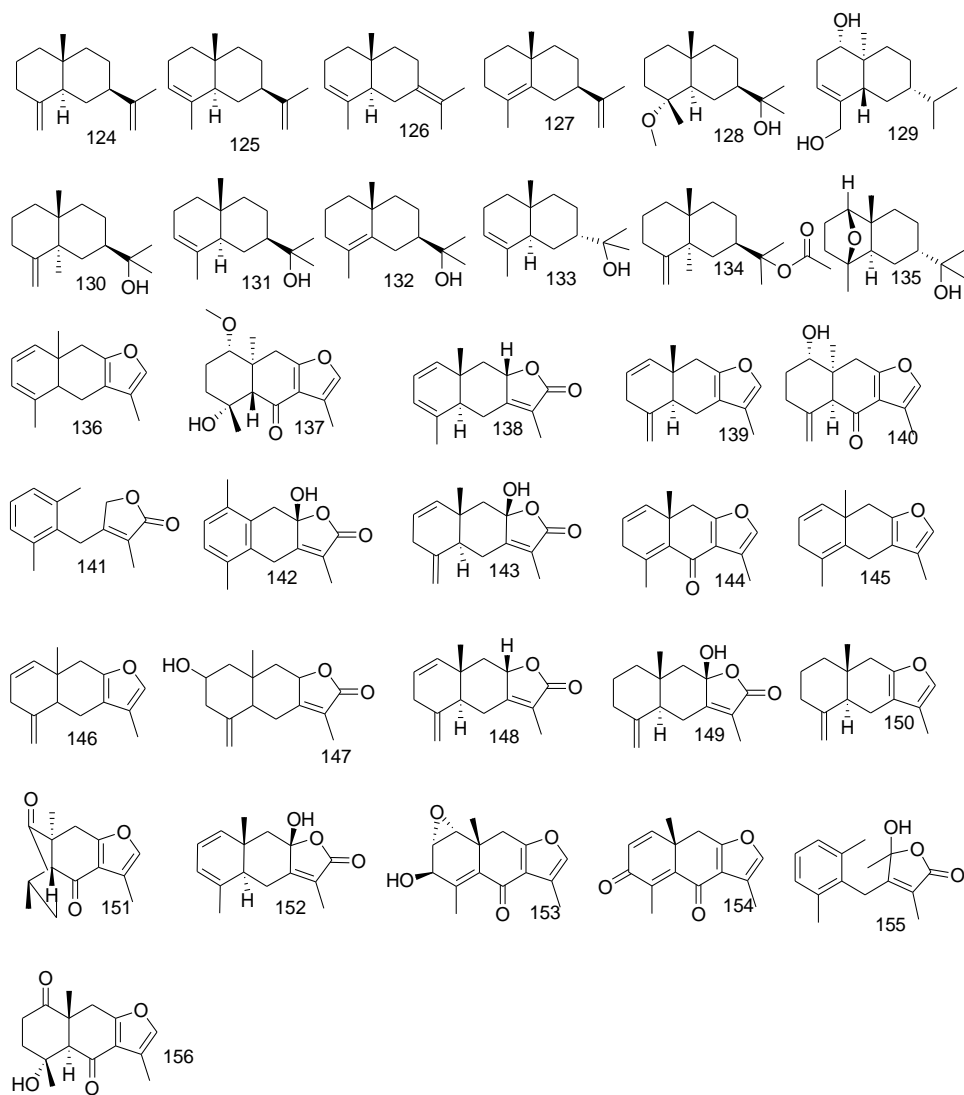
2. Sesquiterpenic compounds structures



3. Sesquiterpenic compounds structures (continuing)

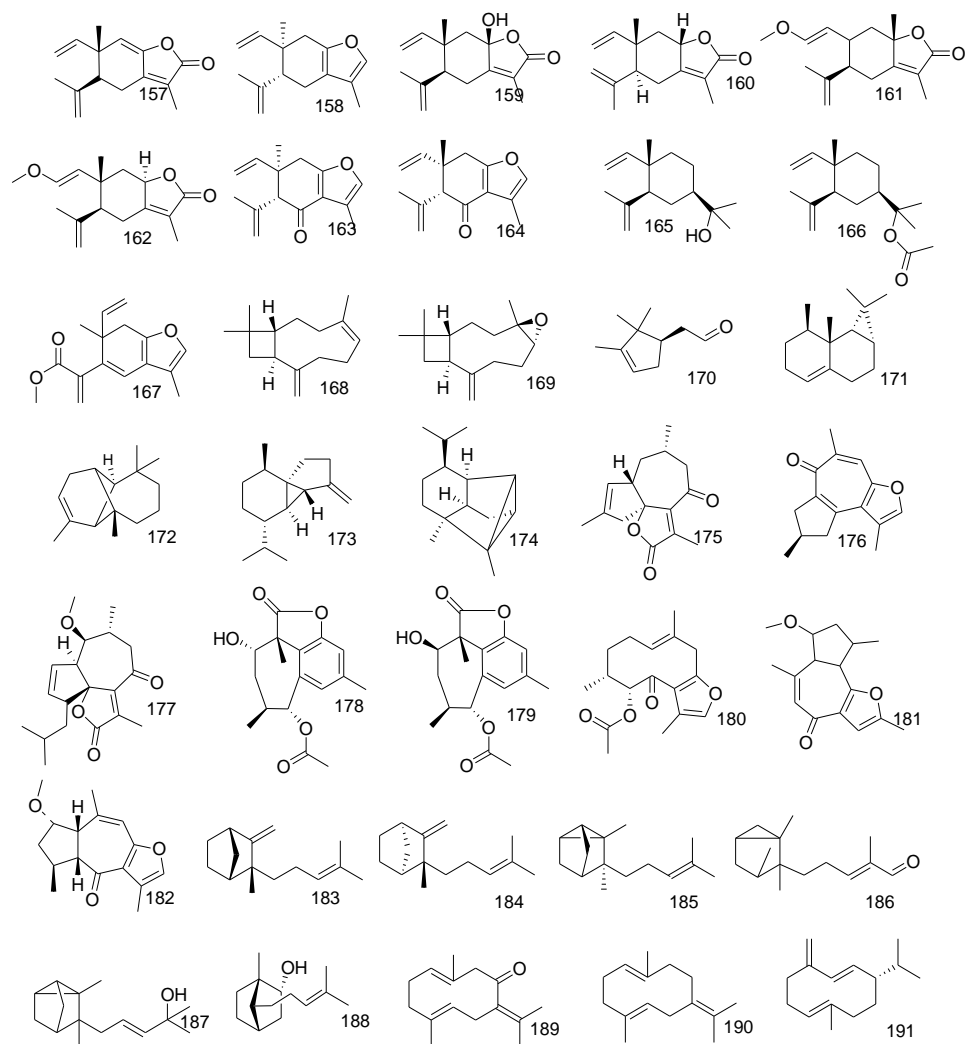


4. Sesquiterpenic compounds structures (continuing)



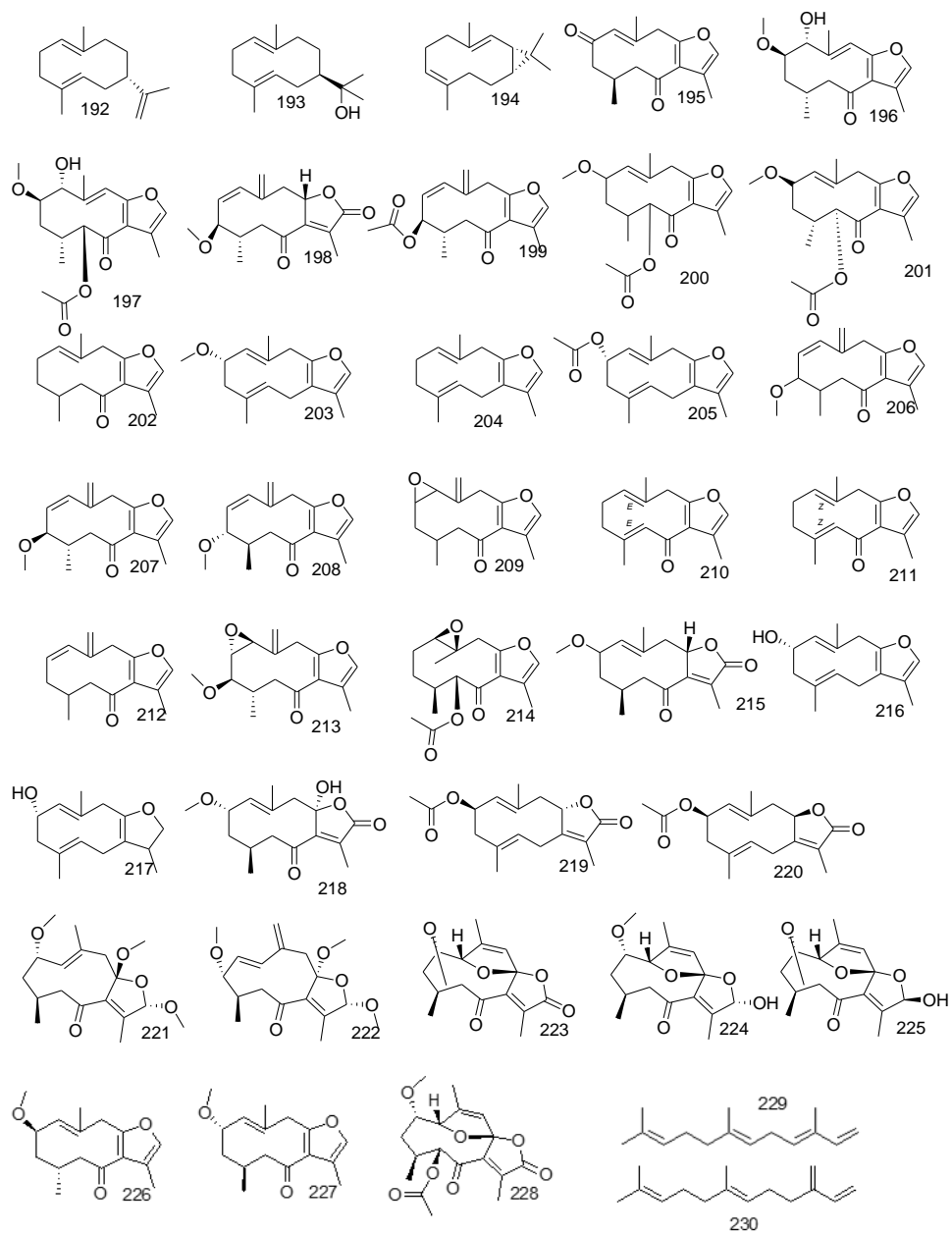
ANNEXES

5. Sesquiterpenic compounds structures (continuing)

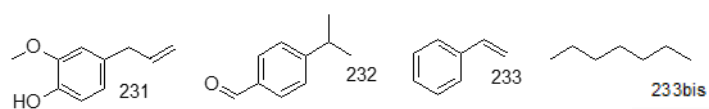


ANNEXES

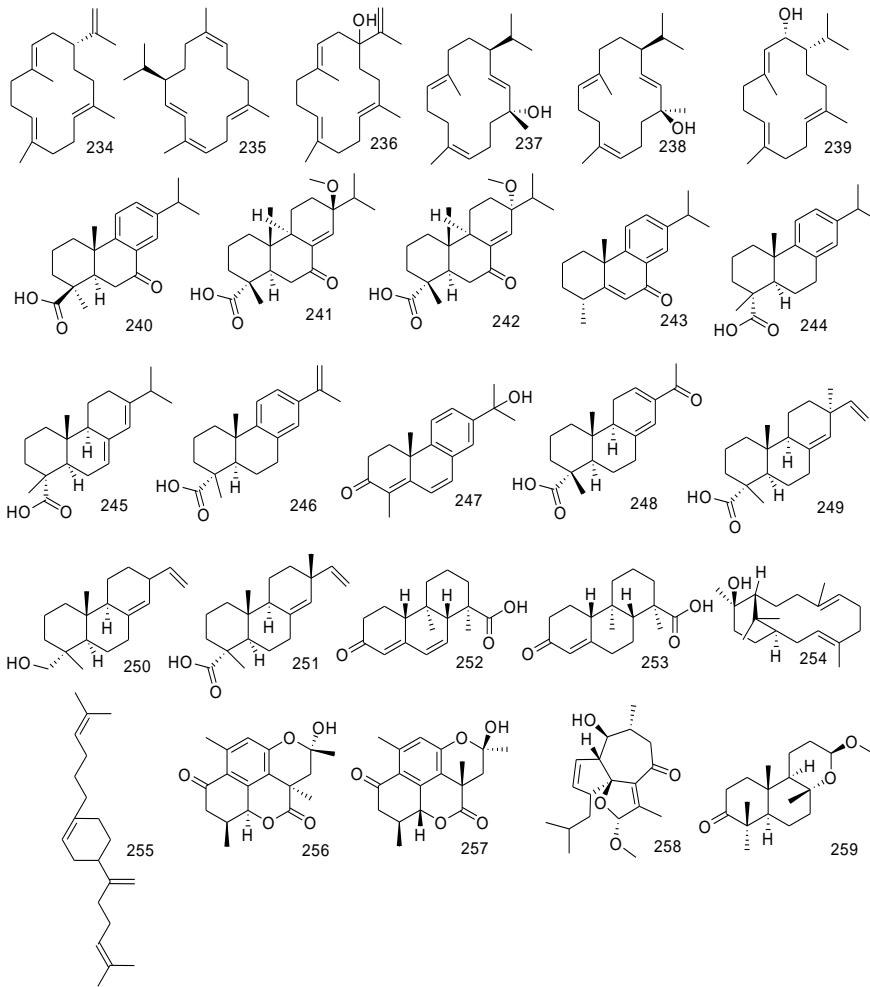
6. Sesquiterpenic compounds structures (continuing)



7. Miscellaneous compounds, phenylpropanoids, benzaldehydes



8. Diterpenic compounds



2. Monoterpenes

To date, about fifty volatile monoterpene compounds have been identified in myrrh oleo-gum resin. Acyclic monoterpenes such as β -ocimene **3** or linalool derivatives were already reported previously. However, they are rarely found in myrrh resins, especially from *C. myrrha*, although when they are found in myrrh, their content is high, especially for β -ocimene **3**. [170]

Most of monoterpenes have only been identified by GC-MS analyses or IR spectroscopy, and only a few components have been characterized by NMR spectroscopy. However, these relatively low molecular weight compounds can be easily misidentified because many isomeric compounds are found. Taking the case of the compound α -terpinene **18**, it differs from its isomer the γ -terpinene **19** only in the location of the bond in the structure, giving a mass spectrum with identical fragment ions. Thus, differentiation of isomers solely by mass spectrum can lead to misallocation of compounds, even if MS interpretation is done cautiously by looking at the relative intensities of fragment ions. Sometimes, chromatographic retention times can help if multiple isomers are present in the same sample, but NMR studies or direct injection of the standard or chemical synthesis of the compound are required to determine the isomeric form in the resin. As an example, Sheehama et al., were the first authors to co-inject an authentic sample to be sure of the identification of the compound γ -terpinene **19** [339]. Similarly, the position of the methyl group in p-cymene **12**, the location of the bonds for phellandrene **9**, elemene **21** or the hydroxyl group in menthol **10** identified in myrrh should be confirmed by complementary analyses to mass spectrometry.

Some species of myrrh correspond mainly to monoterpene-rich resins. A recent update of the chemical composition of "Balm of Judea" (*C. gileadensis*) was possible thanks to the work of several authors who have identified monoterpenes as major constituents of the resin, accounting for almost 90% of the oleo part of the myrrh [329,374,383]. This atypical profile has never been observed in other species of myrrh, although *C. tenuis* and *C. cyclophylla* also have a high content of the monoterpene α -pinene **36**, representing about 60% for *C. tenuis*, and about 50% limonene **7**, for *C. cyclophylla* [327,334]. Similarly, the composition of *C. campestris*, *C. africana* and *C. ogadensis* was mostly found to possess monoterpenes [303]. Another atypical resin containing a high content of monoterpenoids is that of *C. wildii*, containing about 75% monoterpenes and oxygenated derivatives, and other components, including sesquiterpenes, account for about 1% this resin [339].

3. Sesquiterpene content of myrrh resins

In most *Commiphora* spp., the oil part of the myrrh oleo-gum-resin consists mainly of sesquiterpenes [170]. The so-called « true myrrh » has been rigorously identified since the works of Dekebo et al., in 2002. They found that myrrh was characterized by typical markers such as 34% furanoeudesma-1,3-diene **136**, 12% of lindestrene and about 2% of curzerene **158**, and the presence of 2-methoxyfuranodiene **202** and 2-acetoxifyfuranodiene **204** was detected in the resin. These compounds were not found by these authors in other species such as *C. kataf*, *C. holtziana* and *C. sphaerocarpa*. Similarly, a high content of β -elemene **24** was found. Dekebo et al. also showed here that *C. kataf* resembles *C. holtziana* its composition, with about 15% of a furanosesquiterpene and 22% of epoxygermacra-1,7,10,11-tetraen-6-one, and that *C. sphaerocarpa*; contains monoterpenes with 11% α -selinene **125** and was found to possess T-cadinol **99** compared to other resins. [167]

For *C. erythrea* species "opopanax", a high β -ocimene **3** content is a typical marker of the species, and represents the same amount of total sesquiterpene compounds in the resin. Overall, about 30-40% of β -ocimene **3** and total sesquiterpene are found in the resin. The high sesquiterpene content is mainly due to the levels of α -santalene **184** and α -bisabolene **56**. [170] More recently, Marcotullio

et al. conducted another study on this species to see the influence of the extraction technique on the quantitative content of the resin. As expected, variations were observed depending on the technique used but a similar quantitative profile was observed for resins that underwent distillation, and around 37-54% sesquiterpenes hydrocarbons and 18-50% furanosesquiterpenes yield was obtained.[302]

A high sesquiterpene content is also characteristic of *C. habessinica*, with up to 70% sesquiterpenes among which β -elemene **24** and α -selinene **125** are important contributors [353,364]. Brieskorn and Noble first characterized furanosesquiterpenoids in the resin of *C. habessinica*, prior to the identification of these compounds in other *Commiphora* spp [402]. In *C. holtziana* resin, only sesquiterpenes were found, accounting for almost half of the oleo part of the resin [167,360,366]. Other resins have little information in the literature about their content, it is the case of *C. pyracanthoides*, *C. kua*, *C. terebinthina* and *C. cyclophylla*. Several papers described these resins with a content of 30% sesquiterpenes for *C. pyracanthoides* [164], 40% sesquiterpenoids and 33% sesquiterpenes alcohols for *C. kua* [357], and about 30% sesquiterpene content in *C. terebinthina* resin. Another study recently compared different samples of the same species *C. mukul*, and the authors found that the myrrh resin was composed of 5-10% monoterpenes and that most of the oil part was due to a high content of sesquiterpenes hydrocarbons and alcohols [330]. Another sesquiterpene-rich resin is that of *C. guidottii*, with nearly 88% sesquiterpenes [340].

Two recent comparative studies of different species were performed by Madera et al., and Rubegeta et al., in which authors showed that regardless of the species studied, the main compounds were furanosesquiterpenes in all species [184]. Moreover, Rubegeta et al. added that there were around 38% monoterpenes against c.a. 50% of sesquiterpenes in different species[331]. *C. cyclophylla*, was found to contain less than 5% sesquiterpenes, and most of its components are monoterpenoids [327].

Thus, looking at these data, we can sort myrrh resin according to their volatile composition, being either sesquiterpene- or -monoterpene-rich myrrh resin.

4. Conclusion

The myrrh trade dates back three millennia around the incense trade route and the earliest evidence of myrrh's use for medicinal purposes dates back to several centuries BC by the ancient Greek, Egyptians and Roman civilizations. Although the use of myrrh for its fragrance properties is ancient, myrrh is still used today in French perfumery as fixative or perfuming agent. Over the past seventy years, researchers have begun to explore the chemical composition of myrrh oil and myrrh volatile composition. An overview of the composition of myrrh was done over 15 years ago and new volatile compounds have been discovered since that time, and are reported here. Traceability and thus, correct identification of myrrh species is still a challenge today, as resins are sometimes mixed for economic purposes or inadvertently, leading to myrrh adulterations. Actually, some authors identified myrrh oil components based solely on calculated retention indices or mass spectral comparisons, however some errors could occur and result in the misidentification of compounds. In addition, the dubious natural origin of some compounds raises questions about the reliability of results interpretation and requires additional analyses to accurately characterize a compound. Several authors have provided keys to prove the authenticity of myrrh by identifying chemical markers of several species by analytical means, however, a typical composition for each myrrh species is difficult to establish and is most often similar. Here, we reported volatile and semi-volatile compounds found by several authors in resins of different *Commiphora* species, identified in a rigorous manner by LRI and mass spectra comparison with literature data, NMR characterization or standard injection.

ANNEXE 6 : Étude des odorants de *C. myrrha*

1) Optimization of acido-basic extraction of myrrh essential oil

Table 1: Optimization of acido-basic extraction for fractionation of *C. myrrha* oil

mass of oil	volume NaOH added (mL)	extraction solvent neutral part (mL)	extraction solvent acidic part (mL)	pH	yield acidic fraction (%)	notes
5,6	3x30	5x50	3x90	1	1	
5,9	3x30	5x30	3x45	9	0,7	
			3x45	1	0,8	
			3x45	10,2	0,3	
5,7	3x30	5x30	3x45	8,9	0,3	few compounds in pH10 and 9
			3x45	1	0,4	
			3x45	9	0,5	neutral compounds in acidic part
9,7	3x22	3x30	3x45	1	1,2	
			3x30	9	0,4	
12,2	3x30	4x30	3x30	1	0,5	OK

ANNEXES

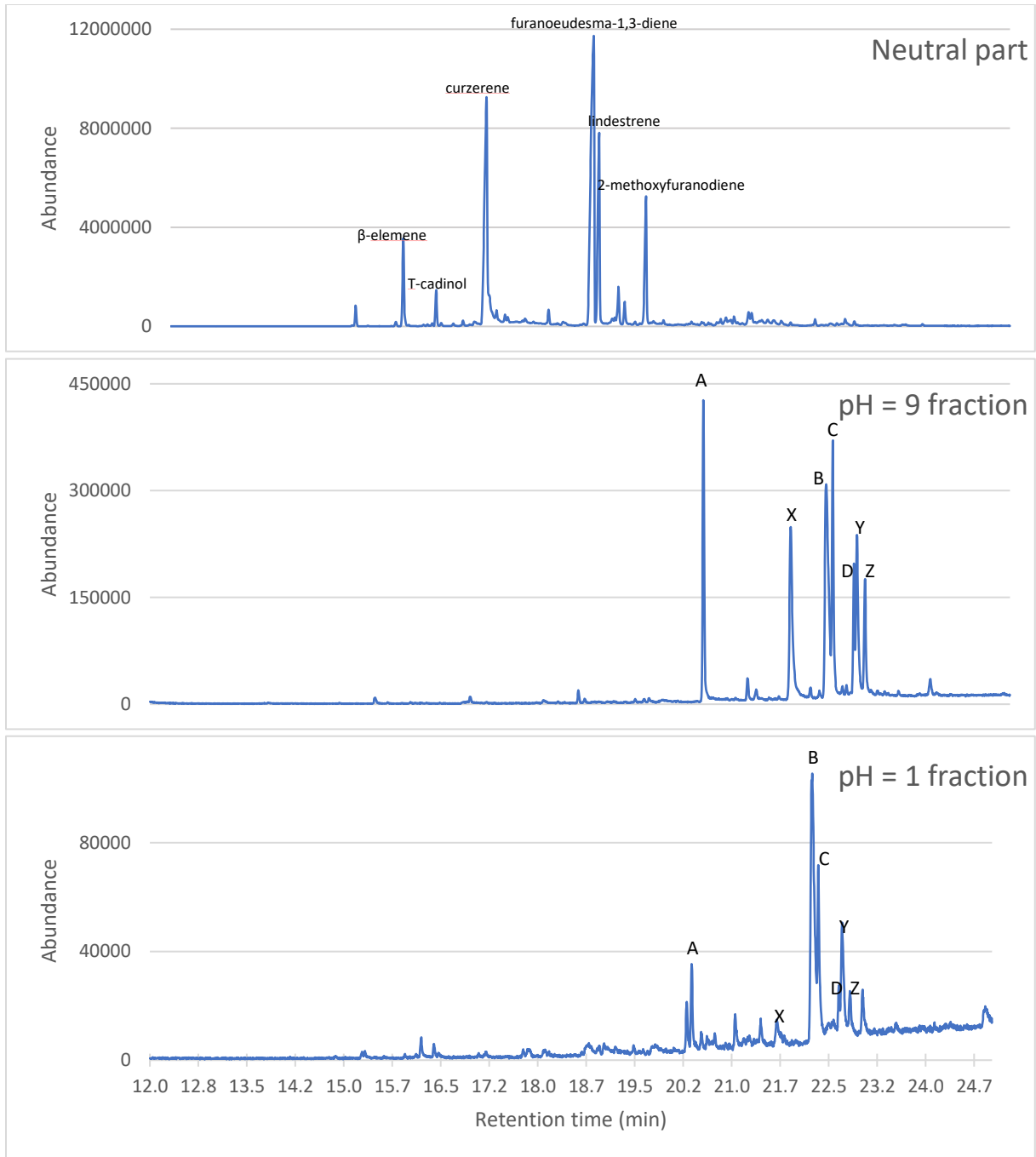


Figure 1 : GC-MS chromatograms of fractions obtained after acido-basic extraction on 209g of myrrh essential oil. Letters above peaks correspond to unidentified compounds.

2) MS spectra of unknown compounds from myrrh essential oil

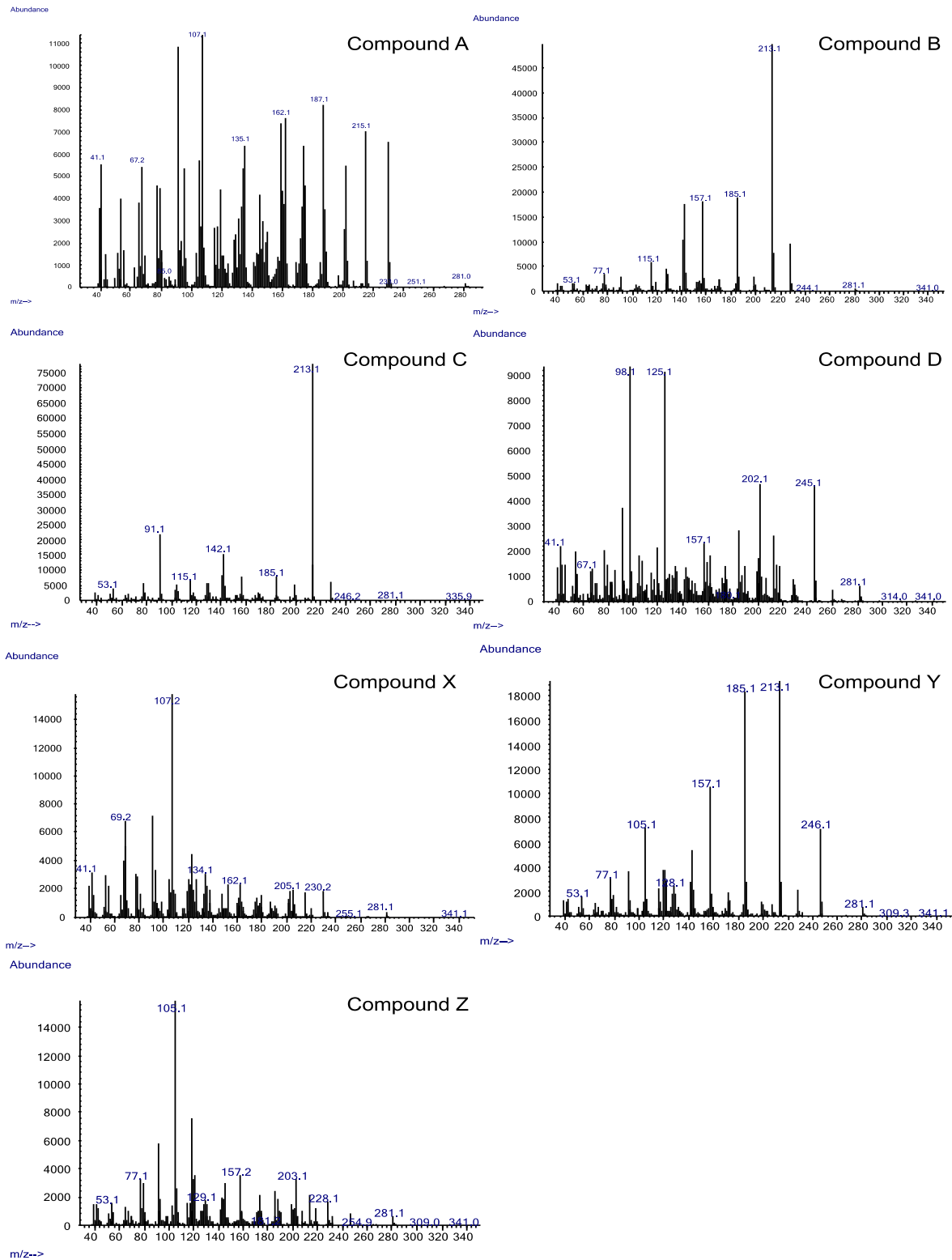


Figure 2 : Mass spectra of compounds from acid part of myrrh essential oil. Fragmentation: 70 eV. Compounds A-D found in «pH = 9 fraction» and compounds X-Z found in «pH = 1 fraction».

ANNEXES

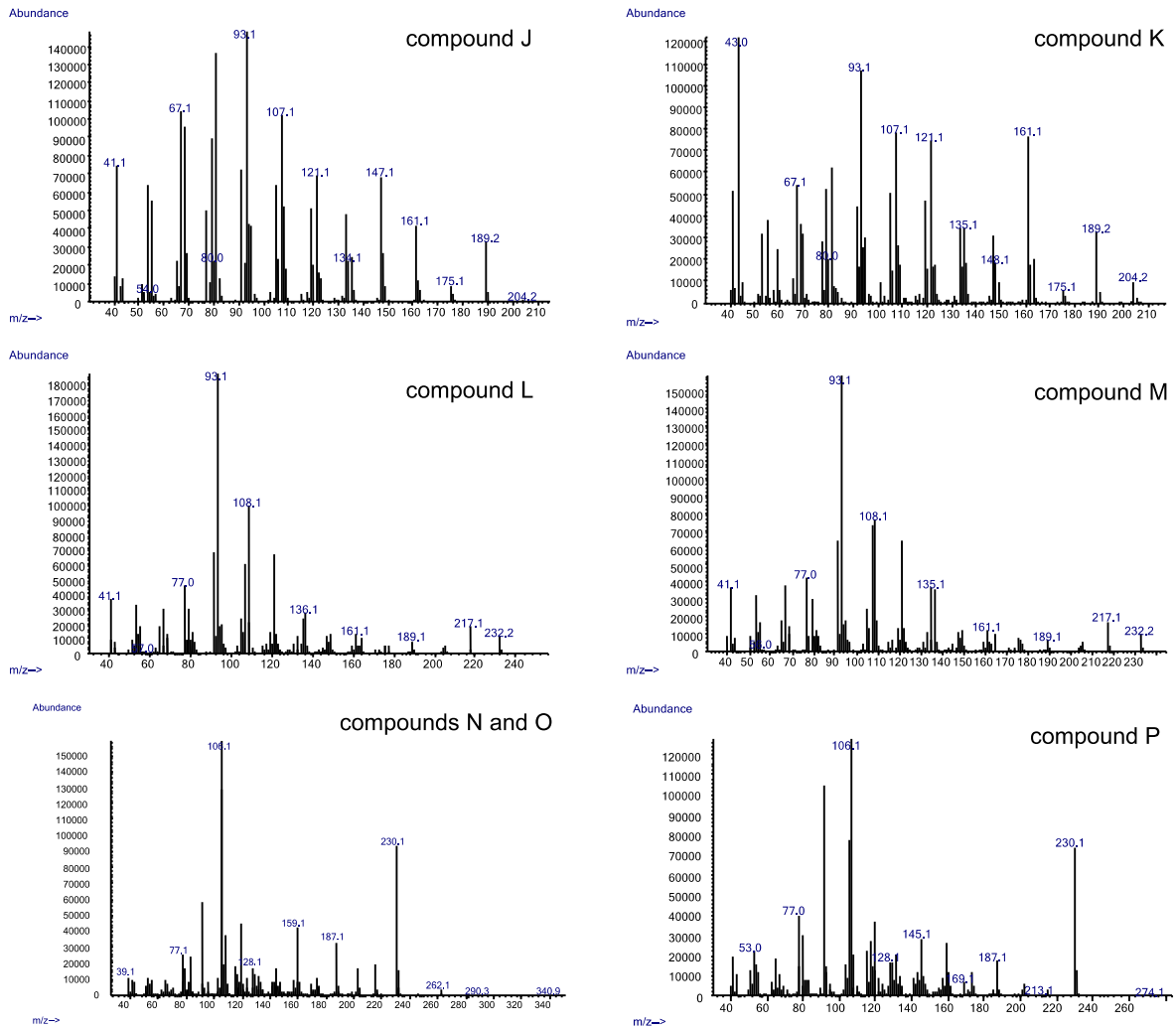


Figure 3: Mass spectra of compounds from head of distillation of myrrh essential oil «F1 fraction». Fragmentation: 70 eV. Mass spectra of compounds from myrrh oil after thermal treatment are shown.

ANNEXES

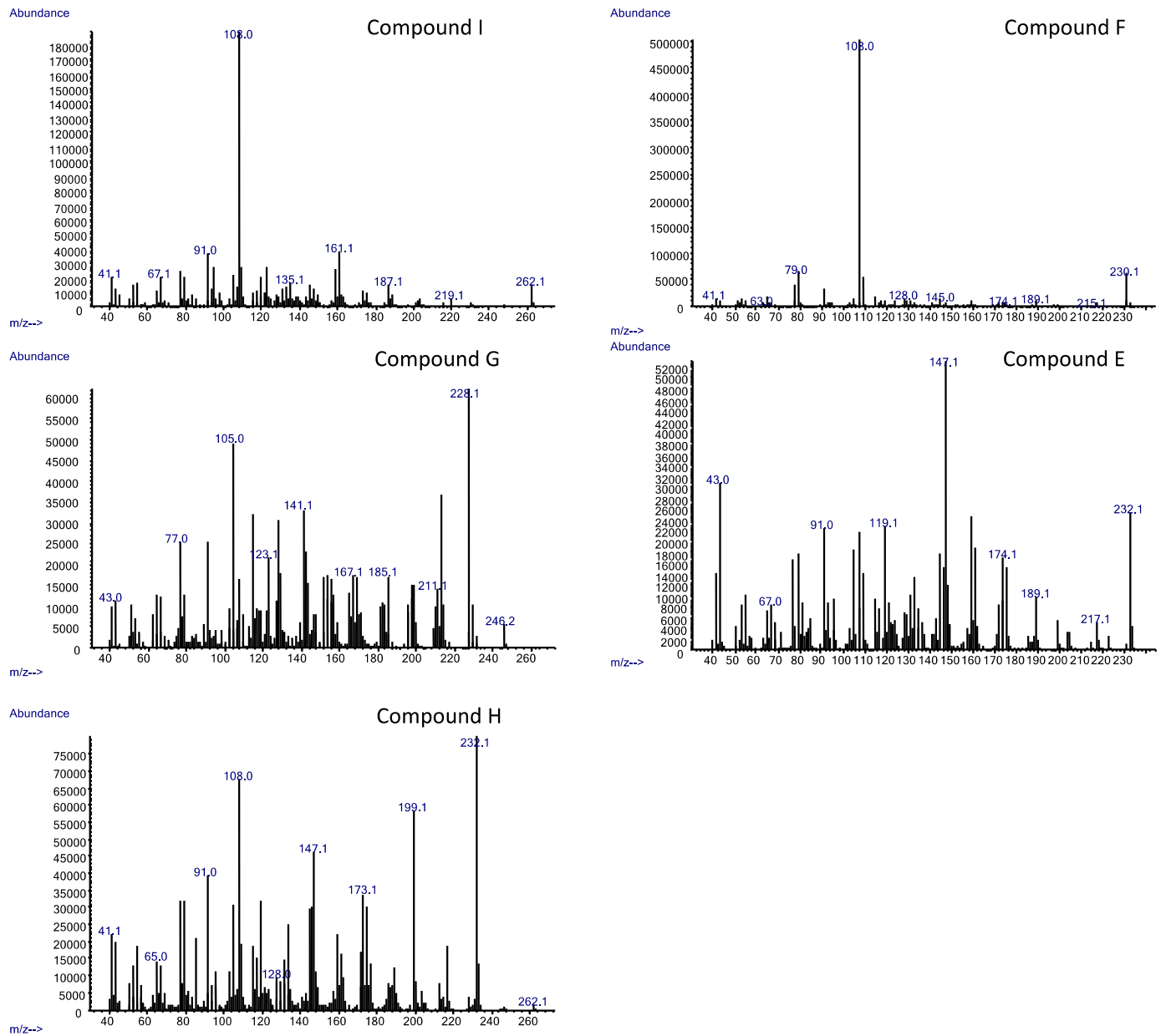


Figure 4 : Mass spectra of heavier compounds from neutral myrrh essential oil without the head of distillation. Fragmentation: 70 eV. The attributed names of unidentified compounds are written in the top right of their respective mass spectra.

ANNEXES

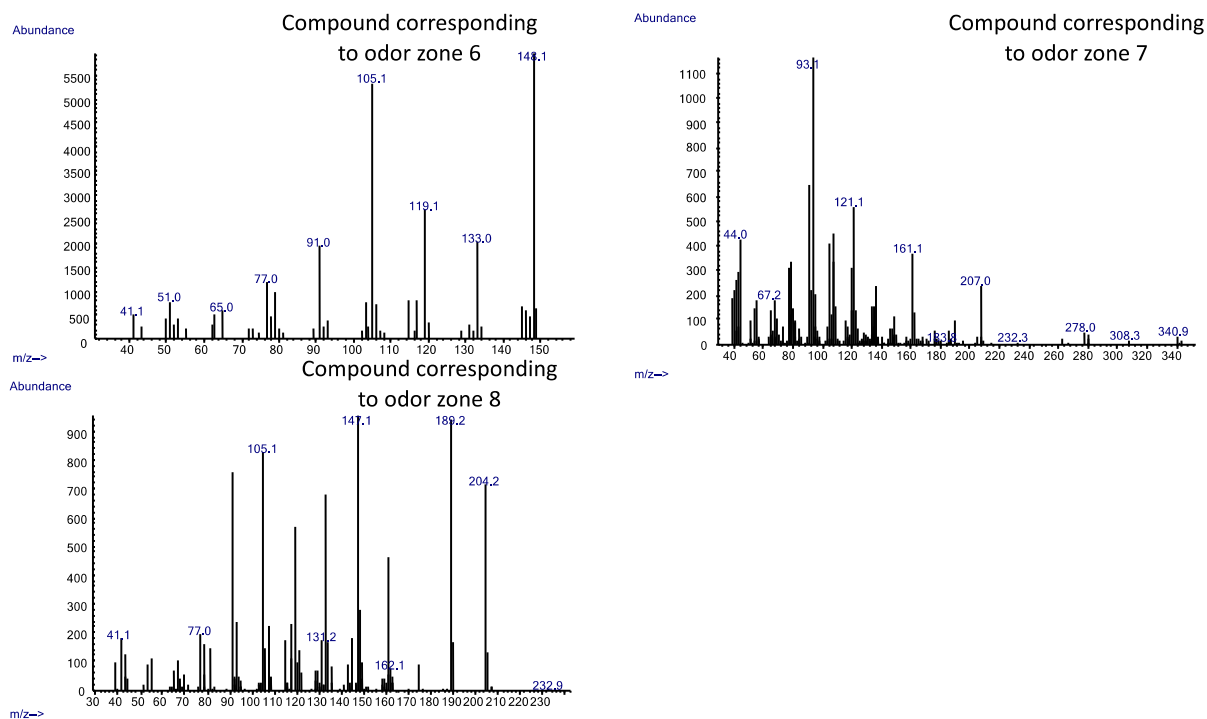


Figure 5 : Mass spectra of other compounds identified in myrrh essential oil. Fragmentation: 70 eV. The attributed name of unidentified compounds are written in the top right of their respective mass spectra.

3) NMR data of compounds isolated from myrrh essential oil

Table : 1D and 2D NMR Data of **compound I** from myrrh essential oil. The compounds is represented below, with the corresponding carbon numbers.

n°C	¹³ C δ (ppm)	multiplicity	¹ H δ (ppm) by HSQC	COSY ¹ H- ¹ H	HMBC H→ C
1	214.3	CO	-	-	-
2	143.2	C	-	-	-
3	137.2	CH	6.16	1.77	5,7
4	113.1	CH ₂	4.6	4.87, 1.52	10, 14
			4.87	4.6, 1.52	14, 10
5	108.2	C	-	-	-
6	100.8	CH	4.49	1.88	-
7	58.7	C	-	-	-
8	56.8	CH	1.88	4.49, 2.32	-
9	55.5	CH ₃	3.20	-	6
10	52.7	CH	2.17	-	12
11	45.9	C	-	-	-
12	41.9	CH ₂	1.85	1.13	-
			2.32	-	-
13	32.8	CH ₂	1.59	-	-
14	24.8	CH ₃	1.51	4.6, 4.87, 3.26	2, 4
15	19.3	CH ₃	1.13	3.2, 2.32	11, 8, 12
16	14.3	CH ₃	1.76	-	5, 3, 7

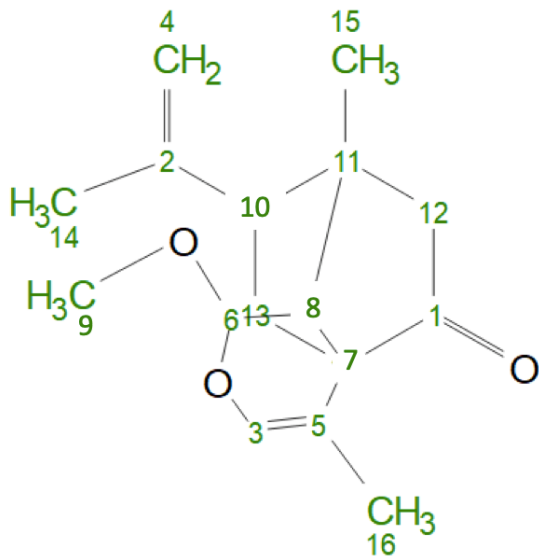
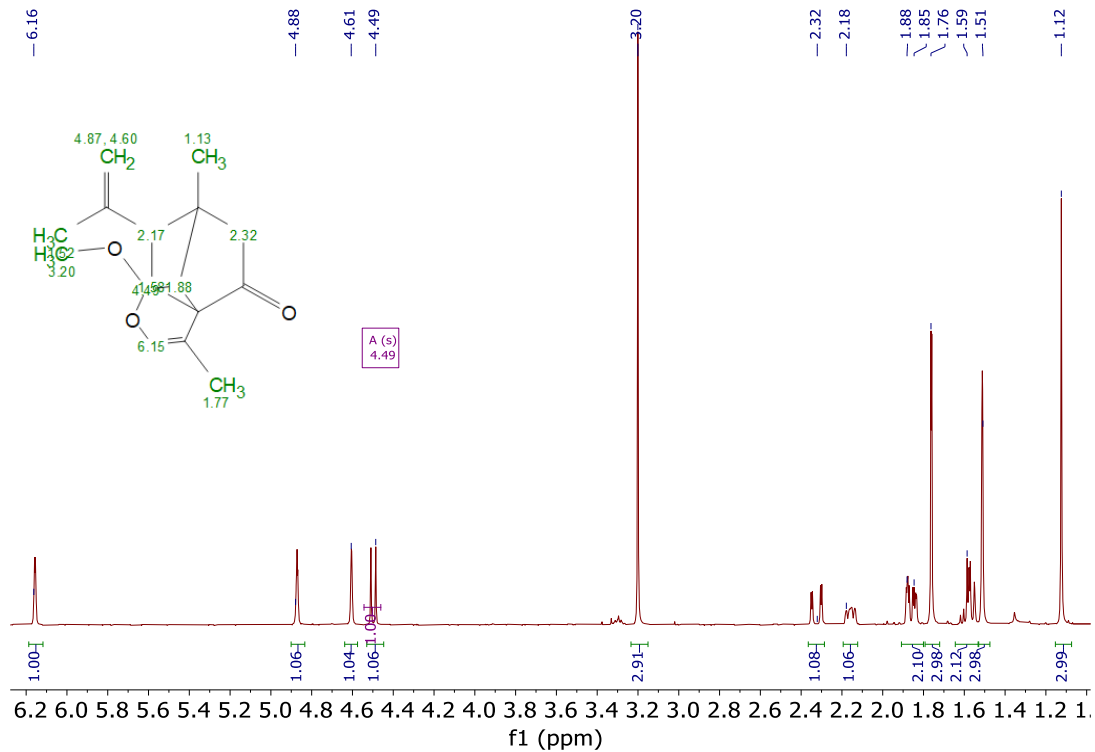


Figure 6 : Structure of compound I, with carbons numbers listed in Table 1 above.

Figure 7 : ^1H NMR of compound I, 400MHz, C_6D_6



ANNEXES

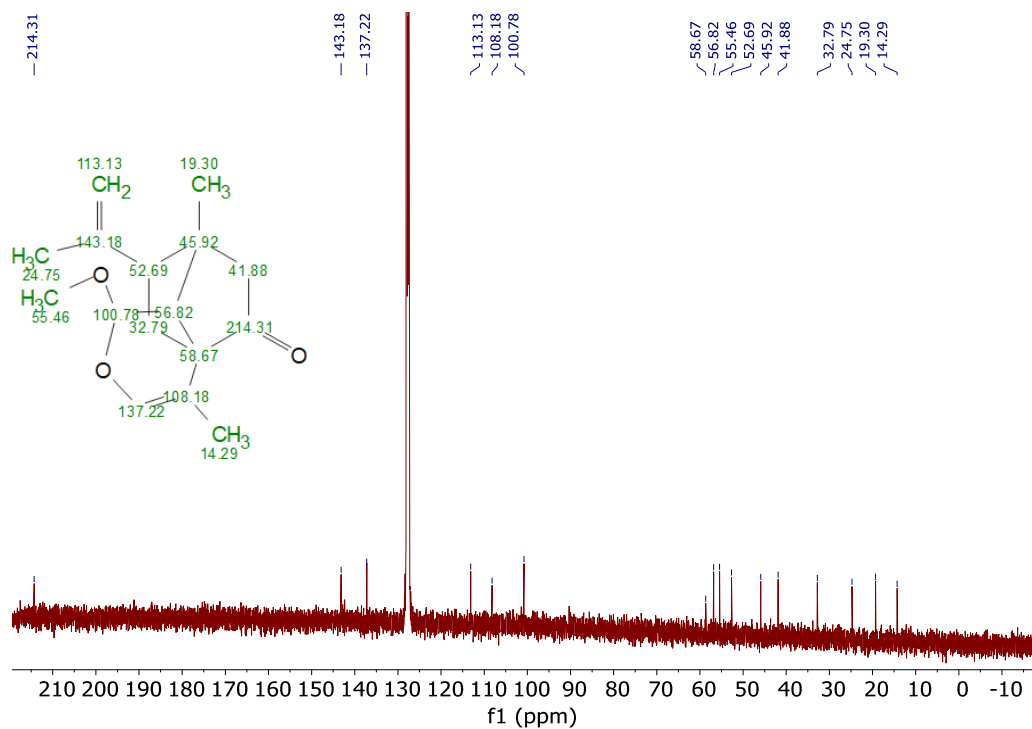


Figure 8 : ^{13}C NMR of compound I, 400MHz, C_6D_6

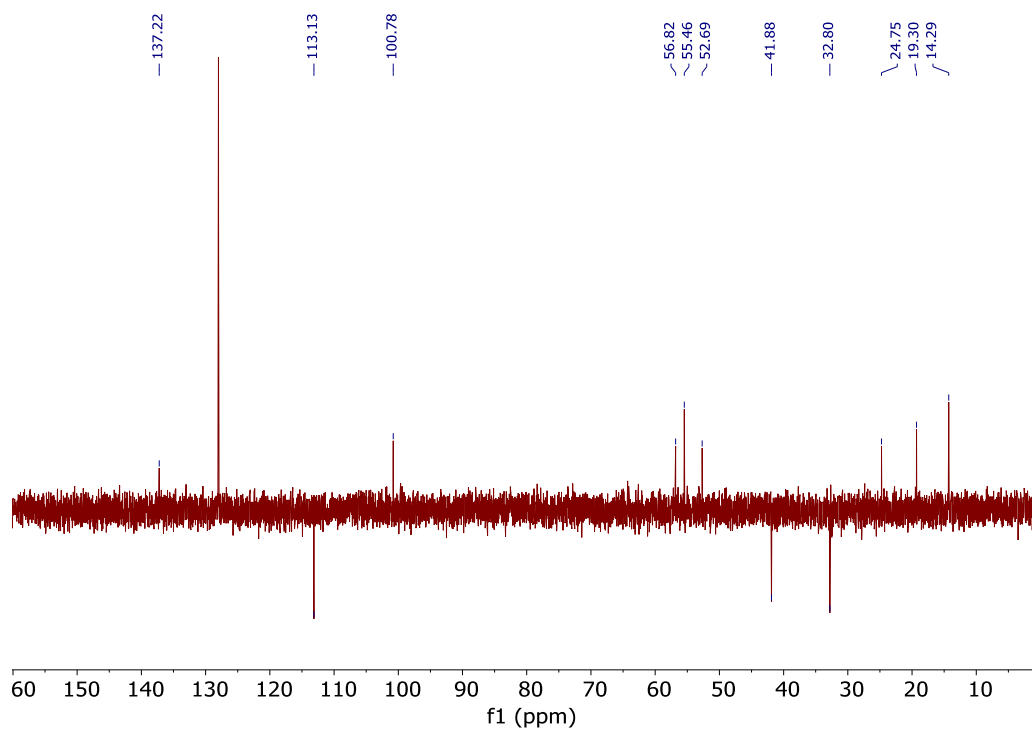


Figure 9 : ^{13}C NMR DEPT135 of compound I, 400MHz, C_6D_6

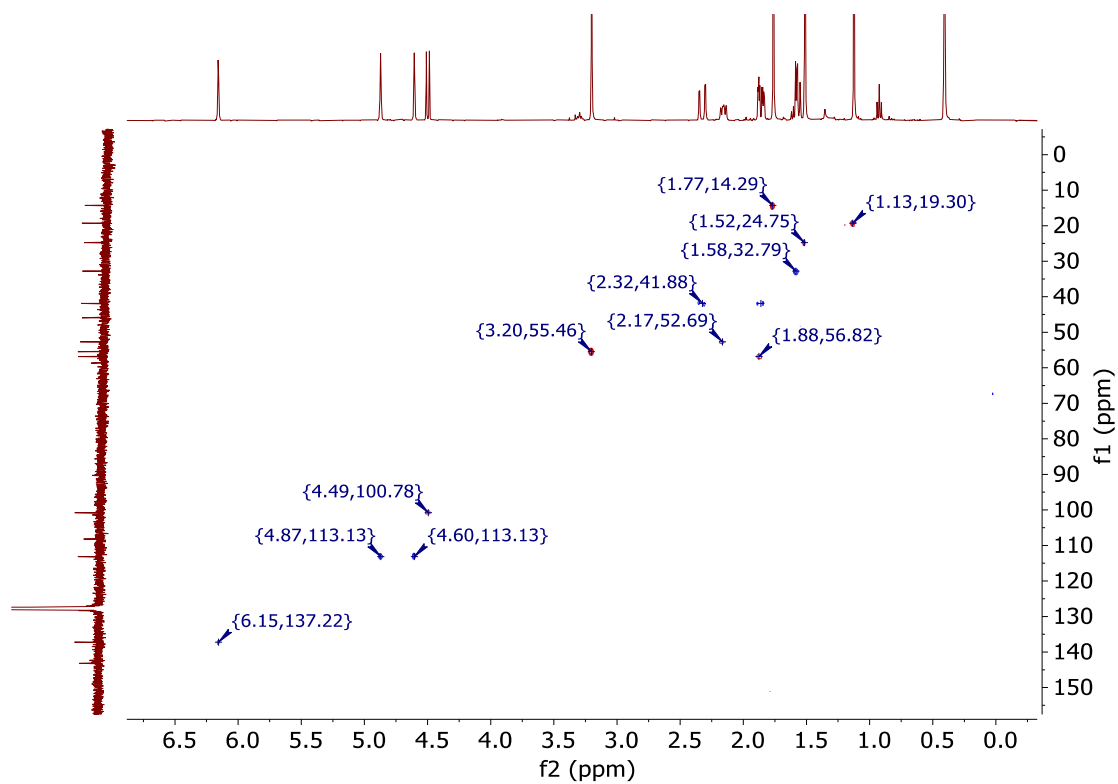


Figure 10 : HSQC 2D NMR data of compound I, 400MHz, C₆D₆

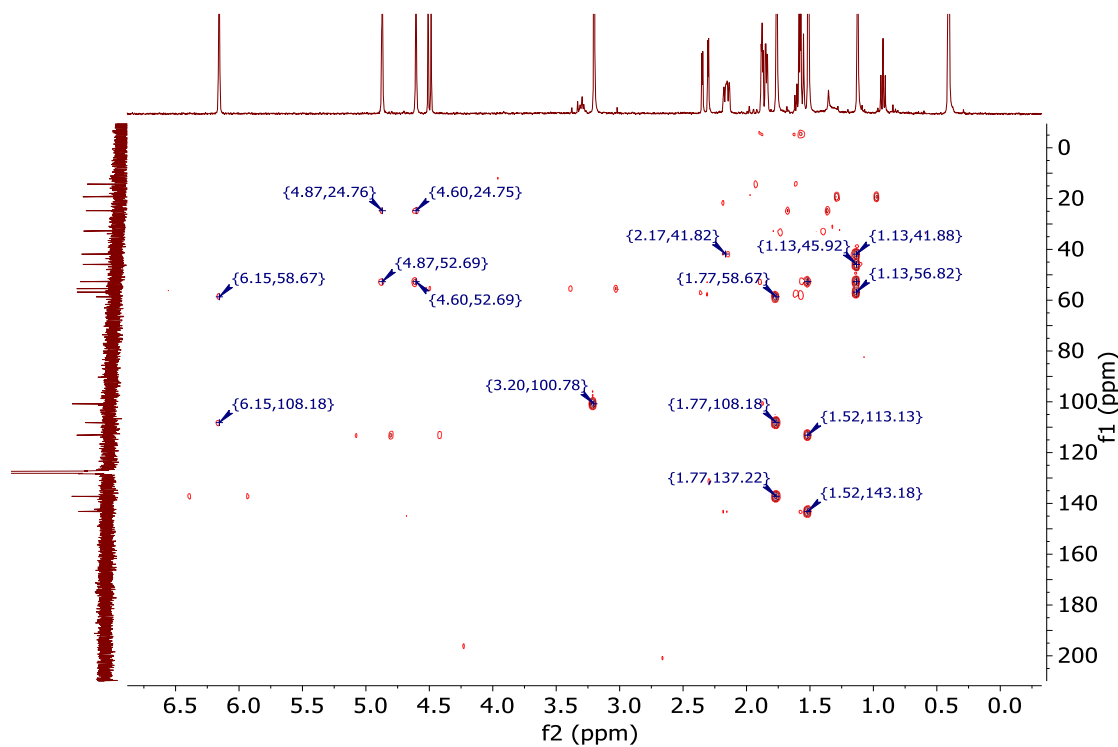


Figure 11 : HMBC 2D NMR data of compound I, 400MHz, C₆D₆

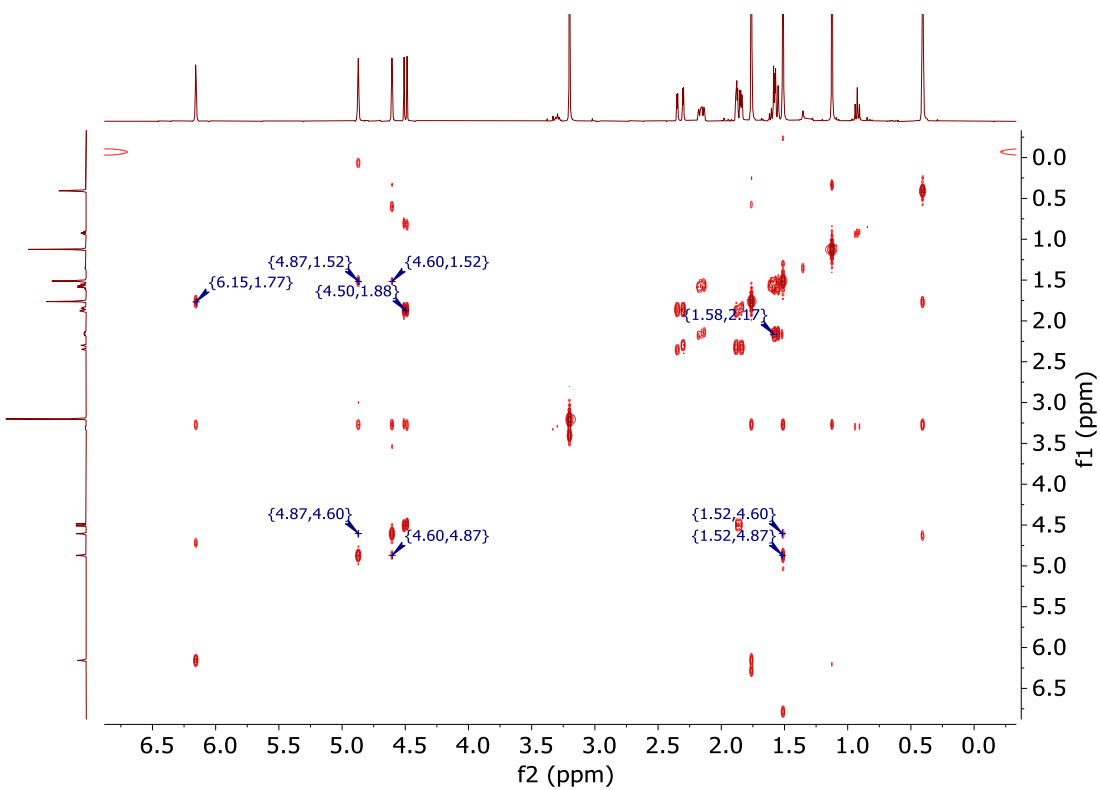


Figure 12 : COSY ¹H- ¹H NMR data of compound I, 400MHz, C₆D₆

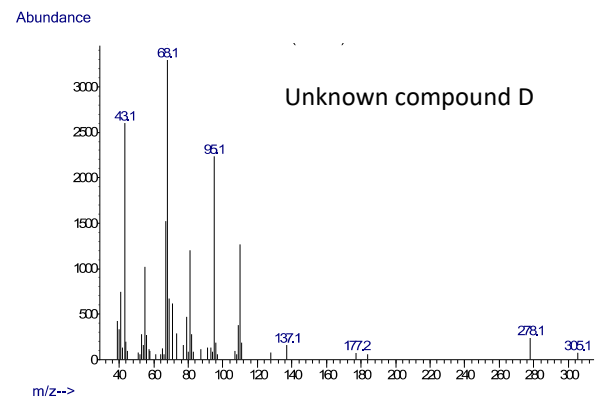
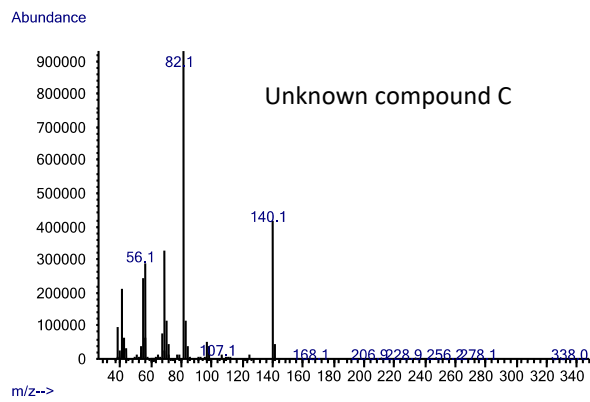
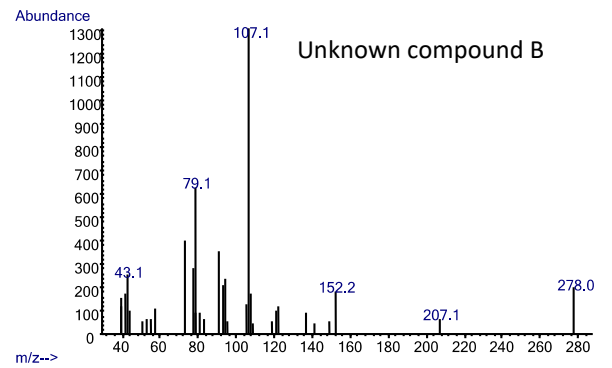
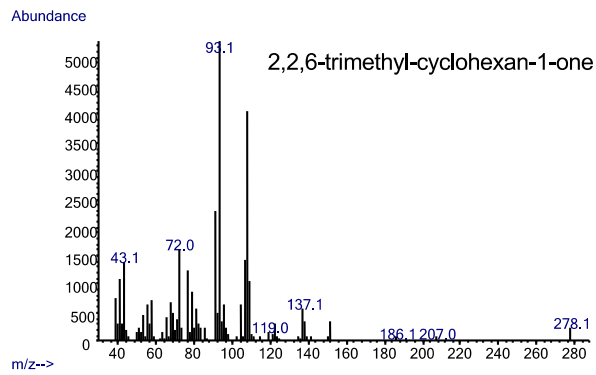
ANNEXE 7 : Étude des odorants de *C. ladanifer*

Figure 1 : Mass spectra of odorant compounds *C. ladanifer* essential oil. Fragmentation: 70 eV.