



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Producción y encapsulación
de un extracto de sarmientos (*Vitis vinífera* L.)
rico en compuestos fenólicos y su caracterización
por espectrometría de masas de alta resolución
(LC-LTQ-Orbitrap-MS)**

Danilo Alejandro Escobar Avelló

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

**PRODUCCIÓN Y ENCAPSULACIÓN DE UN EXTRACTO DE SARMIENTOS
(*VITIS VINÍFERA* L.) RICO EN COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU
CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA
RESOLUCIÓN (LC-ESI-LTQ-ORBITRAP-MS)**

**DANILO ALEJANDRO ESCOBAR AVELLO
2021**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO

ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN

**PRODUCCIÓN Y ENCAPSULACIÓN DE UN EXTRACTO DE SARMIENTOS
(*VITIS VINÍFERA* L.) RICO EN COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU
CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA
RESOLUCIÓN (LC-ESI-LTQ-ORBITRAP-MS)**

Memoria presentada por Danilo Alejandro Escobar Avello para optar al título de doctor
por la Universidad de Barcelona



Dra. Rosa M. Lamuela Raventós



Dra. Anna Vallverdú Queralt



Danilo Alejandro Escobar Avello

**DANILO ALEJANDRO ESCOBAR AVELLO
2021**

FINANCIACIÓN



**Agencia Nacional de Investigación y
Desarrollo (ANID)**



CCiTUB

**Centres Científics i Tecnològics
UNIVERSITAT DE BARCELONA**



**DOCTORADO BECAS
CHILE/2017—72180476.**

**ANID PIA/APOYO CCTE
AFB170007**

ANID/PCI-REDES170051

CORFO 14 IDL2- 30156

**Equipamiento de espectrometría de
masas**

CICYT [AGL2016- 75329-R]

**CIBEROBN
del Instituto de Salud Carlos III,
ISCIII del Ministerio de Ciencia,
Innovación y Universidades
(AEI/ FEDER, UE)**

**Generalitat de Catalunya
[2017SGR 196]**

**Instituto de Investigación en
Nutrición y Seguridad Alimentaria**

**Unidad de Desarrollo Tecnológico
(UDT)
Coronel, Chile.**

AGRADECIMIENTOS

Estas son sin ningún lugar a dudas las líneas más difíciles de escribir. El camino ha sido muy largo y difícil, pero gracias a maravillosas personas que he conocido a lo largo de mi vida he podido llegar hasta aquí. Por eso intentaré agradecer y resumir todo mi cariño a las personas que son parte de este camino; camino que no comienza ni termina con esta tesis doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis Rosa y Anna, que me permitieron llevar a cabo este trabajo. Agradecer a Rosa por aceptarme y permitirme ser parte del gran grupo de “Antioxidantes Naturales” de la UB. También agradecer a Anna por enseñarme todo lo que he aprendido hasta el momento sobre espectrometría de masas de compuestos fenólicos. A ambas mi más profundo respeto y admiración, quiero que sepan que me han inspirado a dar lo mejor de mí durante mis años de doctorado.

También quiero agradecer a todos mis compañeras y compañeros del grupo de “Antioxidantes”, me llevo los más lindos recuerdos de cada uno de ustedes. De la misma forma quiero agradecer a todos los miembros del Departamento de Nutrición, Ciencias de la Alimentación y Gastronomía, en especial a los de “Torribera” donde estuve estos últimos tres años.

Son parte importante también de esta tesis muchas personas de mi querida Universidad de Concepción (UdeC). Quiero agradecer a la Profesora Claudia Mardones y al Profesor Dietrich von Baer por permitirme continuar con la investigación en sarmientos de vid. De igual forma agradecer a la Profesora Carolina Gómez y Javier Avendaño por el trabajo en conjunto en el artículo de encapsulación.

Una parte importante de mi camino para llegar al doctorado fue mi paso por la Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT-UdeC) y todo lo que aprendí de mis colegas y amigos: Cecilia, Karol, Johana, Sebastián, Andy y muchos más. Mención especial para mi querido amigo Danny García, que confió en mí y me ayudó a dar mis primeros pasos en investigación, y me enseñó un poco de la química de los taninos. Querido amigo, estás donde estás, quiero que sepas que cada mención a los “taninos” que hay en esta tesis es en tu memoria.

Ya que hablamos de taninos también tengo que agradecer a mi gran amigo Jorge Santos por las largas y entretenidas conversaciones de taninos y sus diversas aplicaciones que teníamos hasta las 4 am. Muchas gracias por escucharme, me alegra mucho que seas

parte de mi tesis y estoy seguro de que seguiremos trabajando juntos. Muchas gracias por la hospitalidad de toda tu familia, en Galicia, es donde más cerca de mi querido sur de Chile me he sentido.

Mi familia también es parte fundamental de mi educación y sin su apoyo incondicional no podría estar escribiendo esta tesis. En este caso quiero agradecer a mi mamá por todos sus consejos y todo el apoyo que me ha brindado durante mi vida. También a mis hermanos Felipe y Cristóbal que me acompañaron en la distancia. A mi querido “Tata Melo” que despertó en mí la curiosidad científica y sin saberlo me guió en este camino.

No puedo terminar sin agradecer a Paola y Julián mis compañeros en esta aventura. Agradecer especialmente el sacrificio de Paola; muchas gracias por ayudarme a luchar por mis sueños, espero ahora poder ayudarte a concretar los tuyos. Finalmente, a Julián, querido hijo, probablemente no lo entenderás pronto, pero tu sonrisa fue fundamental en esta etapa de mi vida. Gracias por todo el amor que me entregas día a día y espero que esta tesis sea un ejemplo para que sepas que nunca es tarde para luchar por tus sueños.

*En memoria
de mi querido abuelo José Avello Peña*

I. ÍNDICE GENERAL

I.	ÍNDICE GENERAL	10
II.	ÍNDICE DE TABLAS	13
III.	ÍNDICE DE FIGURAS	13
IV.	ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS	14
V.	RESUMEN	17
VI.	ABSTRACT	18
1	INTRODUCCIÓN	20
1.1	La Industria vitivinícola y la generación de sarmientos.	20
1.1.1	Estado Actual de la Vitivinicultura a nivel mundial.	20
1.1.2	Estructura de la vid y generación de sarmientos.	21
1.1.3	Composición química general de los sarmientos de vid.....	23
1.2	Compuestos fenólicos en sarmientos de vid.	25
1.2.1	Flavonoides.....	26
1.2.2	No Flavonoides.....	27
1.2.3	Análisis e identificación de compuestos fenólicos.	29
1.2.4	Métodos analíticos utilizados previamente en la identificación de compuestos fenólicos en sarmientos de vid.....	33
1.3	Extracción de compuestos fenólicos desde sarmientos de vid.	36
1.3.1	Diferencia en la composición fenólica entre cultivares.....	36
1.3.2	Condiciones de almacenamiento posteriores a la poda.	37
1.3.3	Métodos y condiciones de extracción de sarmientos.	39
1.4	Encapsulación de compuestos fenólicos.....	47
1.4.1	Secado por aspersión	47
1.4.2	Encapsulamiento mediante Ciclodextrinas.....	49
1.4.3	Formación y análisis de los complejos de inclusión.....	50
1.4.4	Encapsulación de compuestos fenólicos mediante ciclodextrinas.	52
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
2.1	HIPÓTESIS	55
2.2	OBJETIVO GENERAL	55
2.2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
3	RESULTADOS	57

3.1	CAPÍTULO 1: Perfil fenólico de los sarmientos de vid: Nuevos compuestos identificados por LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS.....	58
3.2	CAPÍTULO 2: Extracción a escala de planta piloto de compuestos fenólicos de sarmientos de vid: Caracterización integral por LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS.....	80
3.3	CAPÍTULO 3: Encapsulación de compuestos fenólicos de un extracto de planta piloto de caña de uva en hidroxipropil beta-ciclodextrina y maltodextrina mediante secado por pulverización.....	91
4	DISCUSIÓN GENERAL	111
5	CONCLUSIONES.....	125
6	CONCLUSIONS.	126
7	REFERENCIAS.	128
8	ANEXOS.....	143
8.1	OTRAS PUBLICACIONES EN REVISTAS	143
8.1.1	Publicación 4: “A Targeted Approach by High Resolution Mass Spectrometry to Reveal New Compounds in Raisins”	143
8.1.2	Publicación 5: “Is eating raisins healthy?”	158
8.1.3	Publicación 6: “Bench-scale extraction of stilbenoids and other phenolics from stored grape canes (<i>Vitis vinifera</i>): Optimization process, chemical characterization, and potential protection against oxidative damage”	158
8.1.4	Otras publicaciones previas	158
8.2	PATENTES DE INVENCION	160
8.2.1	Patente 1: “Un procedimiento para aumentar el contenido de estilbenos, esencialmente resveratrol, en sarmientos provenientes de las podas de <i>Vitis vinifera</i> ”.	160
8.2.2	Patente 2: “Formulación de micropartículas de extracto de sarmientos de <i>Vitis vinifera</i> útil en las industrias nutracéutica y cosmética, además de su proceso de elaboración y sus usos ”	161
8.3	COMUNICACIONES EN CONGRESOS	162
8.3.1	Congreso 1: Condensed tannins in muscatel raisins variety: structural sequencing elucidation by LC-ESI-LTQ-ORBITRAP-MS.....	162
8.3.2	Congreso 2: Grape cane by-products as food additives: Changes in phenolic profile during production and microencapsulation.....	164
8.3.3	Congreso 3: Identification of phenolic compounds in raisins (<i>Vitis vinifera</i> L.) by HPLC-LTQ-ORBITRAP-MS.....	165

8.3.4	Congreso 4: Mediterranean dried fruits are a rich source of phenolic compounds.....	167
8.3.5	Congreso 5: Total polyphenol content of commercial dried fruits.....	169
8.3.6	Congreso 6: Grape cane extracts: An opportunity for the development of novel additives for food Chilean industry.	171
8.3.7	Otros congresos previos	173

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales subproductos generados por la industria vitivinícola.	21
Tabla 2: Composición química de los sarmientos de vid.	23
Tabla 3: Principales compuestos identificados en sarmientos de <i>V. vinífera</i> y su modo de detección..	34

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Superficie de viñedo plantado en los 10 principales países vitícolas	20
Figura 2: Principales estructuras de la vid.....	21
Figura 3: Principales clases y estructuras base de compuestos fenólicos presentes en sarmientos de vid.	25
Figura 4. Representación esquemática del equipo LTQ Orbitrap Velos.....	32
Figura 6: Equipamiento piloto utilizado en la extracción..	115

IV. ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS

mha	Miles de hectáreas
Mill. hL	Millones de hectolitros
p/p	Peso/peso
p.s.	Peso seco
p.h.	Peso húmedo
ton	Toneladas
ha.	Hectáreas
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
RMN	Resonancia magnética nuclear
NIR	Espectroscopía de infrarrojo cercano
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier
FTIR-ATR	FTIR equipado con una unidad de reflectancia total atenuada
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución
HSCCC	Cromatografía en contracorriente de alta velocidad
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos
GC	Cromatografía de gases
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas
MS	Espectrometría de masas
RP	Fase inversa
UV-vis	Ultravioleta-visible
DAD	Detector <i>diodo array</i>
FLD	Detector de fluorescencia
ESI	Ionización por electropulverización
APCI	Ionización química a presión atmosférica
APPI	Fotoionización a presión atmosférica
FAB	Bombardeo de átomos rápidos
MALDI	Ionización por desorción láser asistida por matriz
Q	Cuadrupolo simple
QqQ	Triple cuadrupolo
IT	Espectrómetro de masas con trampa de iones
TOF	Tiempo de vuelo
Q-TOF	Cuadrupolo-tiempo de vuelo
FTMS	Espectrometría de masas por transformada de Fourier
LTQ-Orbitrap	Espectrómetro de masas híbridos basados en trampa de iones lineal acoplado a Orbitrap
m/z	relación masa/carga
MS/MS	Espectrometría de masas en tandem
HCD	trampa C de alta energía
PAL	Fenilalanina amoniaco liasa

STS	Estilbeno sintasas
DPPH	Método de radicales libres, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
FRAP	Poder antioxidante reductor de iones férricos
TE	Equivalentes Trolox
v/v	Volumen/volumen
PEF	Extracción por campos eléctricos pulsados
HVED	Extracción por descargas eléctricas de alto voltaje
EE	Eficiencia de encapsulación
CD(s)	Ciclodextrinas(s)
GRAS	Generalmente reconocidos como seguros
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
HP-β-CD	2-hydroxipropil- β -ciclodextrina
Ph.Eur	Farmacopea europea
USP/NF	Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y Formulario Nacional (NF)
JPC	Codex Farmacéutico Japonés
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
DLS	Dispersión dinámica de luz
^1H RMN	Resonancia magnética nuclear de protones
XRD	Difracción de rayos X
TGA	Termogravimetría
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
ORAC-FL	Capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC), utilizando fluoresceína (FL)
ABTS$^{\bullet+}$	Ensayo de capacidad antioxidante, 2,2-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
DW	Peso seco (<i>dry weight</i>)
GC_{PPE}	Extracto de sarmientos a escala de planta piloto
LOQ	Límite de cuantificación
QM	<i>Quinone methide</i>

RESUMEN / ABSTRACT



V. RESUMEN.

La industria vitivinícola genera una gran cantidad de subproductos. Entre ellos el subproducto más abundante son los sarmientos de vid originados durante la temporada de poda. Los sarmientos de vid poseen una mezcla compleja de compuestos fenólicos los que incluyen ácidos fenólicos, flavonoides, y estilbenos, que a su vez están asociados con una amplia gama de beneficios para la salud. El perfil fenólico de los sarmientos es altamente dependiente del tipo de cultivar, la zona geográfica de cultivo, y de las condiciones de almacenamiento posteriores a la poda. Los procesos y sistemas de extracción también influyen fuertemente en el perfil de los compuestos fenólicos. Aunque existen numerosos estudios de recuperación e identificación de compuestos fenólicos obtenidos desde sarmientos de vid, muy pocos de ellos se han centrado en el estudio del escalamiento de los procesos de extracción y en el efecto sobre el perfil fenólico. Por otro lado, los compuestos fenólicos son reconocidos por ser inestables y sensibles a altas temperaturas, la luz, el pH y las enzimas oxidativas y degradantes. Estas variables afectan al perfil fenólico tanto en los procesos de producción como en la estabilidad de los productos finales. Una opción viable a escala industrial que permite solucionar estos problemas es la encapsulación de estos compuestos en ciclodextrinas, que les proporcionan una matriz protectora y les ayuda a preservar sus actividades biológicas. Por todas estas razones, esta tesis tiene por objetivo estudiar los cambios en el perfil fenólico de un extracto de sarmientos durante su producción y encapsulación, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. La espectrometría de masas de alta resolución basada en LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS ha demostrado ser una poderosa herramienta de identificación y caracterización de compuestos fenólicos. El uso de este equipo nos permitió identificar nuevos compuestos en los extractos de sarmientos de vid producidos a escala de laboratorio. También fue útil para estudiar los cambios en el perfil fenólico durante la extracción a escala piloto y posterior encapsulación de estos compuestos en ciclodextrinas. Los resultados de esta tesis doctoral permitieron ampliar el conocimiento del perfil fenólico de los extractos de sarmientos de vid, analizar las diferencias de los extractos desde la extracción de laboratorio, a la extracción piloto hasta su posterior encapsulación en ciclodextrinas, permitiendo el desarrollo de un producto de alto valor agregado y con futuras aplicaciones en las industrias alimentaria y farmacéutica.

VI. ABSTRACT.

The wine industry produces many by-products. The most common by-product is the grape canes (or vine shoots) that are produced during the pruning season. Grape canes contain a complex mixture of phenolic compounds, including phenolic acids, flavonoids, and stilbenes, which in turn have been linked to several health benefits. The phenolic profile of grape canes is highly dependent on the variety, the geographical area of cultivation, and the storage conditions after pruning. Extraction methods and systems also strongly influence the profile of phenolic compounds. Although there are numerous studies on the extraction and identification of phenolic compounds from grape canes, very few of them have focused on the study of the scaling-up of the extraction process and the effects on the phenolic profile. On the other hand, phenolic compounds are known to be unstable and sensitive to high temperature, light, pH, and oxidative and degradative enzymes. These variables affect the phenolic profile both in the production processes and in the stability of the final products. A viable way to address these issues on an industrial scale is to encapsulate these compounds in cyclodextrins, which allows them to obtain a protective matrix and retain their biological activities. For all these reasons, this PhD aims to study the changes in the phenolic profile of a grape cane extract during its production and encapsulation using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. High-resolution mass spectrometry-based on LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS has proven to be a powerful tool for the identification and characterization of phenolic compounds. The use of this equipment allowed us to identify new compounds in extracts of grape canes. It was also useful to study the changes in phenolic profile during pilot-scale extraction and subsequent encapsulation of these compounds in cyclodextrins. The results of this PhD allowed to increase the knowledge of the phenolic profile of extracts from grape canes, to analyze the differences of the extracts from laboratory extraction to pilot extraction and their encapsulation in cyclodextrins, leading to the development of a product with high added value and with future applications in the food and pharmaceutical industries.

INTRODUCCIÓN



1 INTRODUCCIÓN.

1.1 LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA Y LA GENERACIÓN DE SARMIENTOS.

1.1.1 Estado Actual de la Vitivinicultura a nivel mundial.

La superficie mundial total de viñedo para el año 2020 se estimó en 7.3 millones de hectáreas [1]. En la Figura 1 se pueden observar los 10 principales países vitícolas de acuerdo con su superficie plantada: España (961 miles de hectáreas (mha), 13.09%), Francia (797 mha, 10.89%), China (785 mha, 10.69%), Italia (719 mha, 9.79%), Turquía (431 mha, 5.89%), EE. UU. (405 mha, 5.49%), Argentina (215 mha, 2.90%), Chile (207 mha, 2.80%), Portugal (194 mha, 2.70%), Rumanía (190 mha, 2.60%) y otros países (2425 mha, 33.17%).

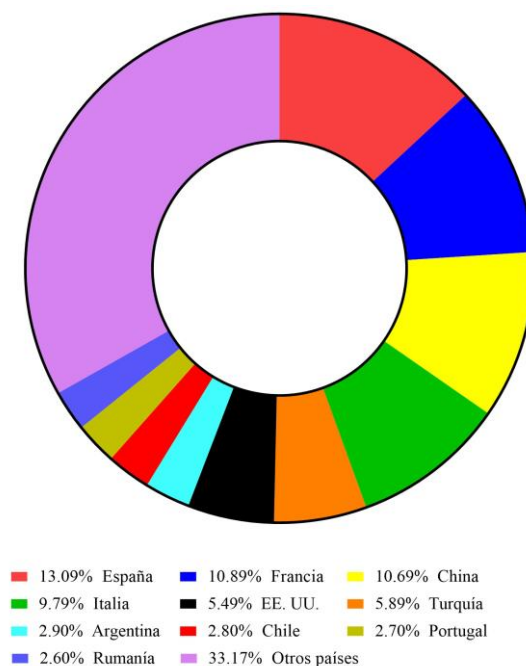


Figura 1: Superficie de viñedo plantado en los 10 principales países vitícolas (Año, 2020).

En relación con la producción mundial de vino para el año 2020 se estimó en 260 Millones de hectolitros (Mill. hL). En este caso los principales productores de vino fueron: Italia (49.1 Mill. hL), Francia (46.6 Mill. hL) y España (40.7 Mill. hL), que en su conjunto representaron un 53% de la producción mundial de vino para ese año [1]. La actividad vitivinícola genera una gran cantidad de residuos o subproductos sólidos

llegando a ser un 30% peso/peso (p/p) del material utilizado [2]. En la Tabla 1 se muestran los principales subproductos de la industria vitivinícola entre los que se encuentra el orujo, los tallos, la piel y las semillas de uva; lías de vino, y los sarmientos de vid que son el subproducto más abundante.

Tabla 1: Principales subproductos generados por la industria vitivinícola.

Subproducto	Aproximado sobre el total de uvas
Orujo de uva	15% p.s. (25 – 45 % p.h.)
Tallos de uva	2.5 – 7.5 %
Semillas de uva	3 – 6 %
Lías de vino	3.5 – 8.5 %
Sarmientos de vid	2 – 5 ton/ha/año

p.s. peso seco; p.h. peso húmedo; ton. toneladas; ha. hectáreas.

Adaptado de Dávila et al., (2017).

1.1.2 Estructura de la vid y generación de sarmientos.

La forma de una planta de vid cultivada se desarrolla podando y entrenando a la vid en una disposición específica de acuerdo con diversos sistemas de manejo del cultivo. En la Figura 2 se puede observar las principales estructuras de la planta, las que son regularmente clasificadas en términos vitivinícolas de uso común que muchas veces difieren a las definidas por los botánicos [3].

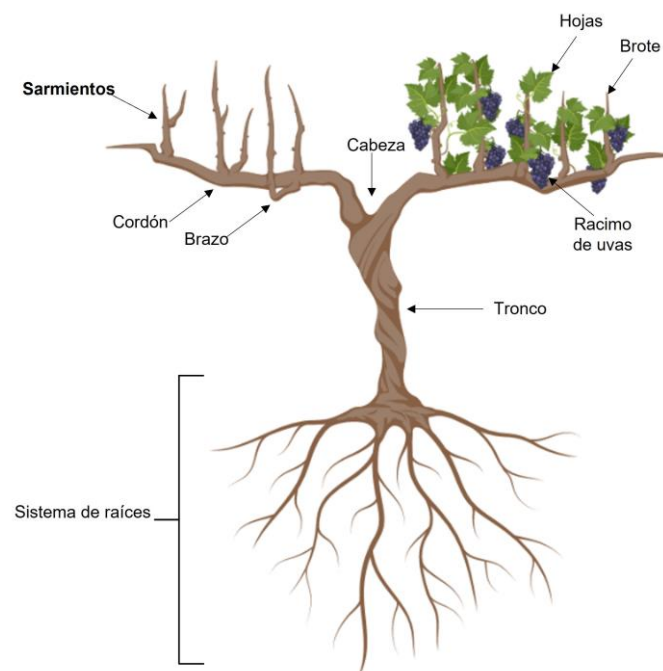


Figura 2: Principales estructuras de la vid.

El tronco, que anteriormente fue un brote individual, es una estructura permanente que sostiene todas las demás estructuras vegetativas de la planta sobre el suelo. La altura de cabeza se determina podando la planta durante las primeras etapas de formación de vid. El tronco de una planta madura tiene brazos o ramas cortas que dan origen a las cañas o sarmientos de vid. El brote denominado en inglés como “*vine-shoot*” comienza su maduración a medida que desarrolla el tejido peridermico, que comienza en la base del brote, apareciendo una piel amarilla y suave. El peridermo continúa desarrollándose hacia la punta del brote durante el verano y el otoño, durante este tiempo, su coloración cambia de amarillo a marrón convirtiéndose en una capa de corteza seca, lisa y dura. En el periodo de maduración de los brotes, las paredes celulares de los tejidos se engruesan y se produce una acumulación de almidón (carbohidratos de almacenamiento) en todas las células vivas de la madera y corteza. Una vez que las hojas se caen al suelo el brote maduro es considerado un sarmiento de vid [3], y es denominado en inglés como “*grape cane*”. Sin embargo, debido a que los sarmientos son simplemente un brote maduro, los términos en inglés “*vine-shoot*” y “*grape cane*” son muchas veces utilizados indistintamente por los investigadores.

La poda de la vid es un proceso necesario en las prácticas vitícolas, ya que permite equilibrar el crecimiento de la planta influyendo directamente en la forma, tamaño, cantidad y calidad de la uva. Esta práctica agrícola genera una importante cantidad de subproductos estimándose entre 2 a 4 toneladas por hectárea, dependiendo principalmente de las prácticas de manejo como el tipo o estructura de la plantación y el uso final del cultivo, ya sea para uva fresca o para la producción de vino [4]. Por lo tanto, teniendo en cuenta los 7.3 millones de hectáreas de superficie plantada estimados por la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino) para el año 2020, se podría esperar una generación de entre 14.6 a 29.2 millones de toneladas de sarmientos de vid a nivel mundial para ese año. Tradicionalmente los sarmientos son utilizados como acondicionadores de suelo o como biomasa para producir energía. Sin embargo, debido a su riqueza química son investigados principalmente como fuente de compuestos bioactivos con promisorias aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética [5].

1.1.3 Composición química general de los sarmientos de vid.

La composición química de los sarmientos se encuentra fuertemente influenciada por la variedad del cultivar y el sistema de crecimiento o entrenamiento de las plantas [6,7]. En la Tabla 2 se muestra un resumen de la composición química general de los sarmientos de vid, obtenida de diferentes fuentes bibliográficas.

Tabla 2: Composición química de los sarmientos de vid.

Fracción/Análisis	Rango-Contenido (%)	Referencias
Humedad	5.0 - 8.3	[6,8]
Proteínas	6.7 - 28.1	[8,9]
Extraíbles	3.1 - 9.1	[10,11]
Holocelulosa	64.2 - 69.6	[6]
α -celulosa *	37.8 - 43.6	[6]
β -celulosa *	43.4 - 47.4	[6]
γ -celulosa *	10.7 - 15.4	[6]
Celulosa	34.0 - 41.4	[2,11]
Hemicelulosa	19.0 - 27.0	[10,12]
Xilano	12.3 - 12.8	[10,12]
Sustituyentes arabinosilo	1.4	[10]
Sustituyentes galactosilo	3.2	[10]
Sustituyentes mano silo	1.6	[10]
Grupos acetilo	4.3 - 5.3	[10,12]
Ácido galacturónico	4.1	[10]
Lignina	19.3 - 38.7	[6,8]
Lignina insoluble	34.1	[8]
Lignina soluble	4.6	[8]
Cenizas	1.0 - 3.8	[8,13]
Mg	0.05 - 0.22	[7,8]
Ca	0.02 - 0.89	[7,8]
Fe	0.002 - 0.004	[7,8]
Cu	0.002 - 0.002	[7,8]
Zn	0.0007 - 0.004	[8,9]
K	0.51 - 0.87	[7]
Na	0.01 - 0.08	[7,8]
P	0.04 - 0.09	[7,9]
Al	0.001 - 0.004	[7]
As	0.0001 - 0.001	[7]
B	0.0008 - 0.0018	[7]
Ba	0.0003 - 0.0007	[7]
Cd	< 0.0001	[7]
Cr	0.0001 - 0.0005	[7]
Mn	0.002 - 0.004	[7]
Ni	< 0.0002	[7]
Pb	< 0.001	[7]

*% relativo a holocelulosa.

Los sarmientos están constituidos principalmente por holocelulosa (64.2 - 69.6 %), que comprende a su vez las fracciones de celulosa (34.0 - 41.4 %) y hemicelulosa (19.0 - 27.0 %). El principal tipo de celulosa encontrado en los sarmientos es la β -celulosa (43.4 - 47.4 %), y la hemicelulosa presente se caracteriza por mostrar un alto grado de acetilación [10] y está constituida principalmente por xilano (12.3 - 12.8 %). El contenido de lignina (19.3 - 38.7 %) fue reportado en un amplio rango de variación, dependiendo del análisis y la fuente bibliográfica consultada, aunque la lignina insoluble (34.1%) es la que se presenta en mayor proporción [8]. Por su parte, el elevado nivel de proteínas (6.7 - 28.1%) presentes en los sarmientos ha incrementado el interés de este subproducto como fuente de suplementos dietéticos [9].

Los sarmientos de vid poseen un contenido de cenizas relativamente menor (1.0 - 3.8 %) en comparación a las demás fracciones. Sin embargo, una gran cantidad de elementos fueron cuantificados como minerales formadores de estas cenizas. Los principales minerales presentes en los sarmientos de vid son: potasio (0.51 - 0.87 %), calcio (0.02 - 0.89 %), magnesio (0.05 - 0.22 %), fósforo (0.04 - 0.09 %), hierro (0.002 - 0.004 %), boro (0.0008 - 0.0018 %), manganeso (0.002 - 0.004 %), sodio (0.01 - 0.08 %), zinc (0.0007 - 0.004 %), cobre (0.002 - 0.002 %), níquel (< 0.0002 %) y cromo (0.0001 - 0.0005 %). Otros elementos propios de los suelos como aluminio (0.001 - 0.004 %), plomo (< 0.001) y arsénico (0.0001 - 0.001%), fueron reportados en proporciones extremadamente bajas.

Los compuestos extraíbles (3.1 - 9.1 %) de sarmientos incluyen una fracción muy diversa de lípidos, terpenos, aldehídos y compuestos fenólicos [14]. Estos últimos son los que han recibido mayor atención por su alto valor agregado y diversas aplicaciones industriales.

1.2 COMPUESTOS FENÓLICOS EN SARMIENTOS DE VID.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes en el reino vegetal que son sintetizados por la vía del shikimato/fenilpropanoide y/o por la vía del “policétido” acetato/malonato, mediante estas rutas biosintéticas se producen fenoles y polifenoles monoméricos y poliméricos. Exclusivamente, el término “polifenol”, debería utilizarse solo para compuestos que presentan más de un anillo fenólico y que carecen de cualquier grupo funcional basado en nitrógeno en su expresión estructural más básica [15], por lo que en adelante se preferirá usar el término “compuestos fenólicos”. Los compuestos fenólicos se clasifican en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides. Los sarmientos de vid contienen una gran cantidad de compuestos fenólicos incluyendo ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), flavonoides (flavanoles, flavonoles, flavanonoles y flavanonas) y estilbenos (monómeros, dímeros y oligómeros) (Figura 3). Entre ellos, las clases fenólicas más diversa son las proantocianidinas y estilbenos oligoméricos [16–18].

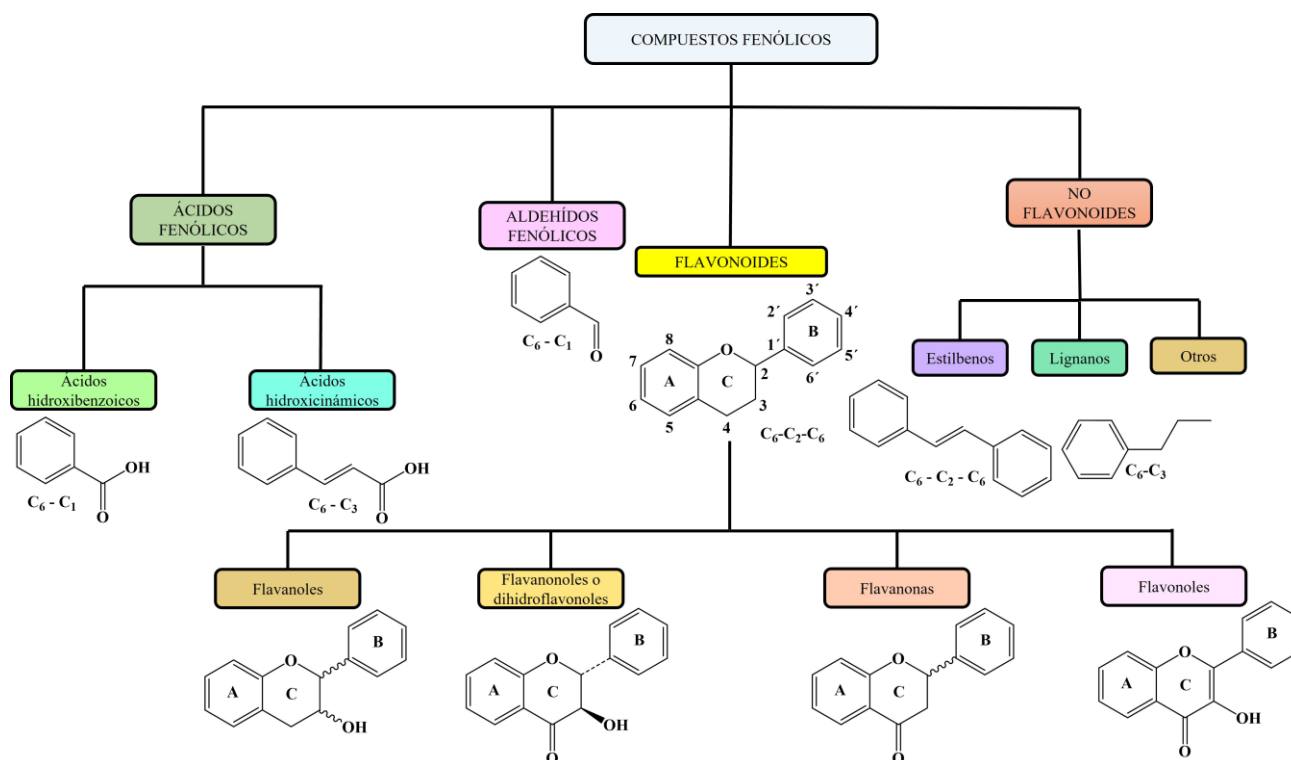


Figura 3: Principales clases y estructuras químicas base de compuestos fenólicos presentes en sarmientos de vid.

1.2.1 Flavonoides.

La estructura básica de los flavonoides está determinada por un núcleo flavónico, que consta de 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos ($C_6-C_3-C_6$), que se denominan anillos A, B y C (Figura 3) [19]. A partir del patrón de hidroxilación y sus respectivas variaciones en el anillo C, los flavonoides pueden dividirse en numerosas subclases, pero las que destacan para esta tesis doctoral son: flavanoles (flavan-3-oles, catequinas y proantocianidinas), flavonoles, flavanonas y flavanonoles (o dihidroflavonoles).

1.2.1.1 Flavanoles.

Los flavanoles se denominan también flavan-3-oles debido a que el grupo hidroxilo siempre se encuentra unido a la posición 3 del anillo C [20]. Los flavanoles son una compleja y extensa subclase de flavonoides que va desde estructuras monoméricas simples como la catequina hasta proantocianidinas oligoméricas y poliméricas [21]. Los dos centros quirales en C2 y C3 del flavan-3-ol monomérico producen cuatro isómeros para cada distinto nivel de hidroxilación del anillo B [21]. Entre los más comunes se encuentra la catequina que es el isómero *trans* y la epicatequina que corresponde a la configuración *cis*. Los flavanoles monoméricos pueden formar polímeros (de hasta 50 unidades o más) que se denominan proantocianidinas o taninos condensados. Dependiendo de los enlaces interflavánicos, que une sus unidades monoméricas, las proantocianidinas pueden tener una configuración de tipo A donde los monómeros se unen a través de enlaces C2–O–C7 o C2–O–C5; o de tipo B en la que sus enlaces se unen entre los carbonos C4 – C6 o C4 – C8 [20]. Las proantocianidinas más comunes son las que se encuentran conformadas por unidades de (*epi*) catequina y se denominan procianidinas, pero existen algunas menos frecuentes que están conformadas por subunidades de (*epi*) afzelequina o (*epi*) gallocatequina que se denominan propelargonidinas y prodelfinidinas, respectivamente [21]. Los flavan-3-oles también pueden transformarse en teaflavinas por la acción oxidativa de la enzima polifenol oxidasa [21]. Tanto flavanoles monoméricos, procianidinas, prodelfinidinas [16,18,22] y recientemente (en esta tesis doctoral) teaflavina fueron identificadas en extractos de sarmientos de vid [16].

1.2.1.2 Flavonoles.

Los flavonoles son una subclase de flavonoides que están constituidos por una 3-hidroxiflavona en el anillo C. Se encuentran ampliamente distribuidos en todo el reino

vegetal abundan en una gran variedad de frutas y verduras como: cebollas, lechugas, tomates, manzanas, bayas, uvas, y bebidas como el té y el vino tinto [20]. Los flavonoles más comunes son el kaempferol, quercetina, isorhamnetina, miricetina y fisetina. Aunque el número de agliconas de flavonoles es limitado, sus patrones de metilación e hidroxilación y su conjugación con glucósidos genera un grupo muy diverso de compuestos [20,21]. Tanto la quercetina como sus conjugados glucósidos fueron identificados en sarmientos de vid [23,24].

1.2.1.3 Flavanonas y flavanonoles o dihidroflavonoles.

Las flavanonas son otra importante subclase de flavonoides que se presentan principalmente en las frutas cítricas como las naranjas, limones y uvas, asociándose como responsables del sabor amargo del jugo y la cáscara de estas frutas [20]. Las flavanonas, estructuralmente tienen el anillo C saturado y se caracterizan por la ausencia del doble enlace y la presencia de un centro quiral en el carbono C-2 [20,21]. Algunos ejemplos de flavanonas son la hesperitina, naringenina y el eriodictyol. Estos compuestos además se presentan regularmente como derivados hidroxilados, glicosilados y *O*-metilados [21]. Las flavanonas son poco frecuentes en extractos de sarmientos de vid, aunque recientemente reportamos la presencia del eriodictyol y un derivado hexósido [16].

Los flavanonoles denominados también como dihidroflavonoles o 3-hidroxiflavanonas, presentan simultáneamente un grupo 4-carbonilo y un grupo hidroxilo en el anillo C. Además, tienen 2 centros quirales en los carbonos C-2 y C-3, mientras que su estereoquímica más común es 2R y 3R. Además, estos compuestos participan como intermediarios en la biosíntesis de flavonoles y antocianidinas [25]. La taxifolina o también denominada dihidroquercetina es un ejemplo de flavanonol que se encuentra presente en frutos cítricos [26]. Antes del presente trabajo doctoral, hasta donde sabemos, no se había reportado la presencia de la taxifolina en extractos de sarmientos [16], aunque si se había reportado su derivado dihidroquercetina-3-ramnósido o también conocido como astilbina [27].

1.2.2 No Flavonoides.

Los compuestos no flavonoides en su configuración más básica presentan un solo anillo aromático, y en sarmientos están representados principalmente por el grupo de los ácidos fenólicos y estilbenos.

1.2.2.1 Ácidos fenólicos.

Los ácidos fenólicos son compuestos caracterizados principalmente por tener un anillo bencénico, un grupo carboxílico y uno o más grupos hidroxilo y/o metoxilo en su estructura más básica [28]. Se encuentran en una gran variedad de alimentos de origen vegetal incluyendo semillas, pieles de frutas, hojas de las hortalizas y aunque pueden encontrarse en forma libre generalmente están unidos a ésteres, glucósidos y amidas. Debido a lo anterior, para su detección deben ser liberados mediante hidrólisis ácida, alcalina o enzimática [26,29]. Los ácidos fenólicos se dividen en dos subgrupos principales los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos.

Los ácidos fenólicos hidroxibenzoicos tienen siete átomos de carbono (C_6-C_1) y aunque son los ácidos más simples que pueden encontrarse en la naturaleza, también son componentes principales de polímeros más complejos como los taninos hidrolizables. Entre los que destacan los galotaninos presentes en mangos y los elagitaninos que se encuentran en frutos rojos como fresas, frambuesas y moras [30]. Los ácidos hidroxibenzoicos comúnmente identificados en sarmientos son los ácidos gálico, protocatechico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico y elágico [24].

Los ácidos fenólicos hidroxicinámicos poseen en su estructura más básica nueve átomos de carbono (C_6-C_3) y por lo general se presentan como ésteres, junto con un alcohol cíclico-ácido, como el ácido quínico, conformando los llamados ácidos clorogénicos [21,28]. Los ácidos hidroxicinámicos más comunes en extractos de sarmientos son los ácidos caftarico, coutarico, cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico [24].

1.2.2.2 Estilbenos.

Los estilbenos ($C_6-C_2-C_6$) son fitoalexinas producidas por las plantas en respuesta a enfermedades, lesiones y estrés [21]. El esqueleto químico de un estilbeno monomérico básico comprende dos anillos aromáticos unidos por un puente de etileno, y su isómero *trans* (*E*) es su configuración más común. La mayoría de los estilbenos naturales contienen varios grupos fenólicos y se encuentran frecuentemente prenilados, geranilados o glicosilados. Los estilbenos oligómeros pueden formarse partir de dos monómeros en diferentes combinaciones como: resveratrol y oxiresveratrol, resveratrol y piceatannol, resveratrol e isorhapontigenina, oxiresveratrol e isorhapontigenina o piceatannol e isorhapontigenina. La principal fuente dietética de los estilbenos son las uvas y el vino tinto obtenidos a partir de la vid (*V. vinífera* L.), mientras que el estilbeno más estudiado es el resveratrol. En la vid los derivados del resveratrol se encuentran en

una gran diversidad de patrones de oligomerización y glicosilación, mientras que la viniferina es el dímero de resveratrol principal en las especies del género *Vitis* [31]. Debido a sus múltiples propiedades beneficiosas para la salud los estilbenos son el grupo fenólico más reportado e investigado en extractos de sarmientos de vid [24]. Por esta razón muchos estudios de extracción de compuestos fenólicos desde sarmientos se han centrado en la optimización y recuperación tanto del resveratrol como de viniferina [32].

1.2.3 Análisis e identificación de compuestos fenólicos.

Se han utilizado una gran diversidad de técnicas analíticas avanzadas para poder identificar y cuantificar compuestos fenólicos en muestras de plantas, alimentos y extractos naturales. Entre ellos destacan la espectrofotometría, electroforesis capilar, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) y por transformada de Fourier (FTIR). Además de métodos cromatográficos como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC), cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HSCCC), cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) y cromatografía de gases (GC) [33]. Desde un punto de vista estructural el RMN es la técnica definitiva que permite la asignación completa de estructuras fenólicas, incluyendo su estereoquímica y posición de sus azúcares o sus derivados. Sin embargo, las limitaciones del RMN son su alto costo y la necesidad de contar con analitos relativamente puros, requiriendo muchas veces exhaustivas etapas previas de aislamiento. Por otro lado, la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas para la caracterización de compuestos fenólicos en mezclas complejas como los alimentos y los extractos naturales [34].

1.2.3.1 Preparación de las muestras.

Antes del análisis las muestras que contienen los compuestos fenólicos deben ser recolectadas, almacenadas y preparadas adecuadamente para su extracción. Para muestras sólidas los procesos de pretratamiento incluyen etapas de tamizado, molienda o trituración y homogeneización, mientras que las muestras líquidas son frecuentemente filtradas o centrifugadas. Las extracciones de compuestos fenólicos se realizan principalmente mediante el uso de solventes orgánicos como metanol, etanol, acetona o

sus mezclas con agua, así como también con acetato de etilo [35]. La extracción se puede llevar a cabo por métodos convencionales sólido-líquido que pueden involucrar o no el uso de temperatura. Por esta razón, los compuestos fenólicos se pueden degradar mediante reacciones como la hidrólisis, ionización y oxidación que ocurren durante el proceso de extracción. Por otro lado, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos como la extracción asistida por ultrasonido y microondas, extracción por fluidos supercríticos y extracción de alta presión hidrostática [33]. En particular, la extracción asistida por ultrasonido es ampliamente utilizada en protocolos de laboratorio y más recientemente fue escalada en aplicaciones piloto [36]. A nivel de análisis de laboratorio la extracción asistida por ultrasonido ha demostrado ser una alternativa económica, simple y eficiente con respecto a las técnicas de extracción convencionales [33].

1.2.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La técnica de HPLC es la más utilizada para la separación, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en muestras naturales complejas. La separación cromatográfica de los compuestos fenólicos depende de varios factores entre los que destacan la estereoquímica, peso molecular, polaridad y el grado de polimerización de los compuestos. El análisis generalmente se realiza en el modo de fase inversa (RP) utilizando columnas de sílice ligada C-8 o C-18, con longitudes que varían de 100 a 300 mm y con un diámetro interno de 2 a 4.6 mm [37].

La aplicación de sistemas binarios es esencial para la separación de compuestos fenólicos debido a su variedad estructural. La elución en gradiente se realiza frecuentemente aplicando agua acidificada, como solvente polar, y metanol o acetonitrilo (puro o acidificado), como disolvente orgánico. De esta forma, el gradiente de elución comienza con la fase acuosa seguida de un incremento sucesivo en la concentración de solvente orgánico con un caudal que varía de 0.3 a 1.6 mL/min. Por su parte el volumen de inyección varía entre 1 a 100 µl y depende del diámetro interno de la columna utilizada [33,37]. En combinación con la separación por HPLC una amplia gama de detectores se ha utilizado para la identificación y determinación de compuestos fenólicos. Entre ellos se incluyen ultravioleta-visible (UV-vis) y detector *diodo array* (DAD), detector de fluorescencia (FLD), métodos electroquímicos, quimioluminiscencia y detectores de espectrometría de masas (MS) [35].

1.2.3.3 Espectrometría de masas.

La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas es un método eficaz para identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de plantas y fluidos biológicos. Se pueden utilizar diferentes tipos de fuentes para la ionización de los compuestos como: ionización por electropulverización (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI), bombardeo de átomos rápidos (FAB), e ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) [33]. En el análisis de los compuestos fenólicos la mayoría de los estudios utilizan fuentes de ionización ESI, que pueden emplearse en modo positivo y negativo, aunque esta última configuración es la más aplicada para este tipo de compuestos [33–35]. Por otro lado, distintos tipos de analizadores de masas se utilizan en el estudio de compuestos fenólicos, entre los que destacan: cuadrupolo simple (Q), triple cuadrupolo (QqQ), espectrómetro de masas con trampa de iones (IT), tiempo de vuelo (TOF), cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF), MS con transformada de Fourier (FTMS) y espectrómetros de masas híbridos basados en trampa de iones lineal acoplado a Orbitrap (LTQ-Orbitrap) [37]. Este último sistema es el empleado en la presente tesis doctoral.

1.2.3.4 LTQ-Orbitrap.

El LTQ-Orbitrap fue comercializado por primera vez en el año 2005 por la empresa *Thermo Electron* ahora llamada *Thermo Fisher Scientific* [38]. El sistema se basa en la captura orbital de iones alrededor de un electrodo central en forma de huso y un electrodo exterior en forma de barril ensanchado que utiliza campos electrostáticos. Los iones en órbita realizan oscilaciones armónicas alrededor del electrodo con una frecuencia característica a su relación masa/carga (m/z) [34,39]. Las oscilaciones de los iones se revelan mediante detección de corriente de imagen y se transforman en espectros de masas utilizando transformación de Fourier que las convierten en señales proporcionales a su intensidad [33,39].

En el año 2009 se lanzó el primer espectrómetro de masas híbrido LTQ Orbitrap Velos [38], que es específicamente el modelo utilizado en esta tesis doctoral. En la Figura 4 se puede observar la representación esquemática del equipo LTQ Orbitrap, que es definido por sus fabricantes como un sistema híbrido debido a que combina dos tipos diferentes de analizadores de masas una primera trampa lineal de doble celda “LTQ Velos” y el analizador “Orbitrap” propiamente tal. A diferencia de configuraciones iniciales y debido a una mejora en el campo de la óptica, el equipo incorporó una nueva guía de

iones de anillo apilado, conocida como lente S (Figura 4), que permitió un aumento de la sensibilidad de 3 a 5 veces en el modo de escaneo completo y hasta 10 veces en el modo MS/MS. LTQ Orbitrap Velos también incorporó novedades en el analizador de masas de trampa de iones con una configuración de doble presión. Primero una celda de alta presión optimizada para aislar y fragmentar iones, seguida de una celda de baja presión optimizada para análisis de iones acelerado. También se incorporaron mejoras significativas en la eficiencia de transferencia de iones dentro del espectrómetro de masas, mediante la disociación de "trampa C de alta energía" (HCD), lo que le permitió obtener espectros mucho más sensibles a 4 – 5 Hz [38]. El analizador de masas Orbitrap, es muy importante para la adquisición de espectros de barrido completo y MS/MS, permitiendo medir las frecuencias de oscilación iónica en un campo electrostático, utilizando el cuadrupolo para el aislamiento de precursores y empleando la celda HCD para la fragmentación [40]. El equipo permite resoluciones de hasta 60.000 a m/z 200, un rango de masa de hasta 4000 (m/z) y errores incluso menores a 3 ppm.

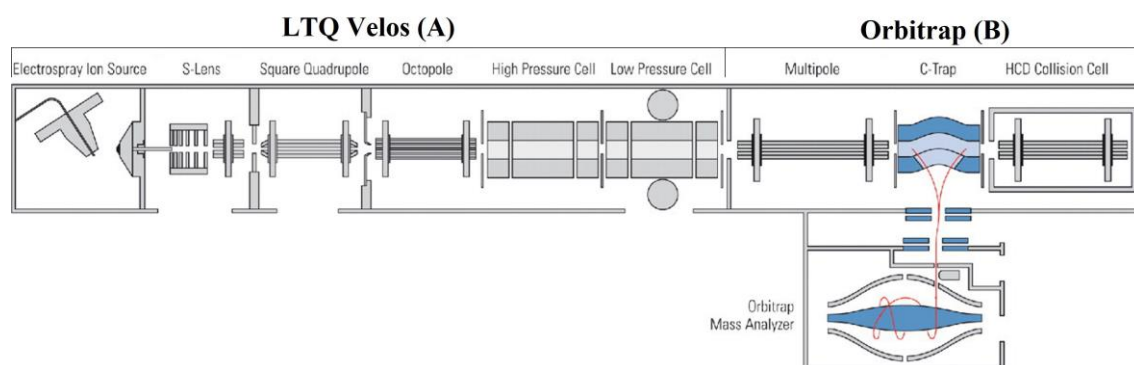


Figura 4. Representación esquemática del equipo LTQ Orbitrap Velos. **(A)** Analizador de trampa lineal de doble celda “LTQ Velos”, incluye una fuente ESI, la guía de iones de anillo apilado (S-Lens) y un diseño de trampa de iones lineal dual de alta presión y de baja presión. **(B)** Analizador de masas Orbitrap, que incluye en su parte superior una celda de colisión combinada de C-trap "trampa C de alta energía" (HCD) [41].

El modo de adquisición también es relevante en los parámetros de trabajo del equipo y tiene una influencia importante en el rendimiento de la detección. El modo de escaneo completo es una de las técnicas de adquisición de datos que se utilizan con mayor frecuencia, ya que permite la detección de todos los iones que llegan al analizador Orbitrap. Por lo tanto, este modo de operación permite adquirir una amplia gama de

información sobre iones precursores con un amplio rango m/z lo que proporciona una poderosa herramienta de análisis para detección y cuantificación de alta resolución y precisión de masa. Otro modo de operación ampliamente utilizado es la adquisición dependiente de datos, que ofrece la ventaja de una alta selectividad. El proceso comienza con un escaneo de levantamiento de MS inicial, y un escaneo de MS/MS que se activa cuando los iones precursores cumplen ciertos criterios predefinidos. El umbral de intensidad se puede utilizar como uno de esos criterios, lo que permite aplicar este modo de adquisición de forma no dirigida. Una vez que se detecta el compuesto objetivo y se alcanza el umbral de intensidad, el ion precursor se selecciona y es enviado a la celda de colisión HCD a través de la trampa C para ser fragmentado [40]. LTQ Orbitrap ha demostrado ser una herramienta muy útil para la identificación de compuestos fenólicos y particularmente el grupo de investigación de “Antioxidante Naturales” de la Universidad de Barcelona, posee una dilatada trayectoria en este ámbito. Mediante esta herramienta se ha ampliado y mejorado la identificación de compuestos fenólicos de matrices como tomates y derivados [42,43], cervezas [44], nueces [45], hierbas y especias [46], pasas [47], entre otros derivados y procesados alimenticios. Por esta razón la presente tesis doctoral propone la identificación de nuevos compuestos fenólicos presentes en extractos de sarmientos de vid mediante el uso de este poderoso equipo (Ver capítulo 3.1).

1.2.4 Métodos analíticos utilizados previamente en la identificación de compuestos fenólicos en sarmientos de vid.

La cromatografía líquida de alta presión acoplada a detectores DAD o FLD son las principales herramientas utilizadas para la detección y cuantificación de compuestos fenólicos en los sarmientos de vid. Sin embargo, con el objetivo de asegurar una correcta identificación y cuantificación de los compuestos, los equipos de HPLC se han utilizado acoplados a espectrómetros de masas o a equipos de RMN [48]. La Tabla 3 muestra un resumen de 49 compuestos fenólicos reportados en sarmientos de vid y sus principales métodos de detección e identificación.

Tabla 3: Principales compuestos identificados en sarmientos de *V. vinífera* y su modo de detección. Adaptado de Goufo et al. [24].

Clase	Subclase	Compuesto	Modo de detección
Ácidos fenólicos y derivados	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido gálico	MS, RMN, DAD
		Ácido protocatechico	MS
		Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	MS
		Ácido vanílico	MS, RMN, DAD
		Ácido siríntrico	MS, RMN, DAD
		Ácido elátrico	MS
		Ácido caftarico	MS, RMN, DAD
	Ácidos hidroxicinámicos	Ácido coumarico	MS, DAD
		Ácido cafeico	MS, RMN, DAD
		Ácido <i>p</i> -cumárico	MS, RMN, DAD
		Ácido ferúlico	MS, RMN, DAD
		Ácido sinátrico	MS
Flavonoides	Flavan-3-oles y proantocianidinas	Procianidina B1	MS, RMN, DAD
		Procianidina A1	MS
		Procianidina C1	MS, DAD
		Procianidina T2	MS, DAD
		Catequina	MS, RMN, DAD
		Procianidina B2	MS, RMN, DAD
		Prodelfinidina tipo A	MS, RMN, DAD
		Galato de dímero de procianidina	MS, DAD
		Epicatequina	MS, RMN, DAD
		Quercetina-3- <i>O</i> -galactósido	MS, RMN, DAD
	Flavonoles	Quercetina-3- <i>O</i> -arabinosa	MS
No- Flavonoides	Estilbenos	<i>trans</i> -resveratrol	MS, RMN, DAD
		(+)- <i>trans</i> - ϵ -viniferina	MS, RMN, DAD
		Isohopeaphenol	MS, RMN
		Vitisina B (r-viniferina)	MS, RMN
		<i>trans</i> -piceatannol	MS, RMN
		<i>trans</i> - ω -viniferina	MS, RMN
		Hopeaphenol	MS, RMN
		Palidol	MS, RMN
		<i>trans</i> -miyabenol C	MS, RMN
		Ampelopsina A	MS, RMN
		Vitisina A (r2-viniferina)	MS, RMN
		<i>trans</i> - δ -viniferina	MS, DAD
		<i>trans</i> -piceido	MS, RMN, DAD
		Vitisinol C	MS
		<i>trans</i> -resveratrol-2- <i>C</i> -glucósido	MS, RMN
		<i>trans</i> -resveratrol- <i>O</i> -glucósido	MS, RMN
		Leachianol G	MS, RMN
		Leachianol F	MS, RMN
		Restrytisol A	MS
		Carafenol B	MS

<i>cis</i> -piceido	MS, RMN
Ampelopsina B	MS, RMN
<i>trans</i> -Isorhapontigenina	MS
Ampelopsina D	MS, RMN
Derivado de <i>trans</i> - ϵ -viniferina (anillo de γ -lactama)	MS, RMN
Derivado <i>trans</i> -resveratrol (anillo γ -lactámico)	MS, RMN

MS: Espectrometría de masas; RMN: resonancia magnética nuclear; DAD: Detector

diodo array

Los estilbenos son la principal clase de compuestos reportados en sarmientos de vid. En la Tabla 3 se presentan 26 estilbenos identificados previamente en sarmientos, entre los que destacan *trans*-resveratrol, (+)-*trans*- ϵ -viniferin, isohopeaphenol, vitisin B, *trans*-piceatannol, *trans*- ω -viniferin, y hopeaphenol como los más reportados. Además, se muestran otros 23 compuestos fenólicos flavonoides y ácidos fenólicos previamente identificados en sarmientos. En estos grupos los más reportados son: los ácidos fenólicos gálico, protocatechico, sinápico, ferúlico; los flavan-3-oles catequina y epicatequina; y las proantocianidinas como la procianidina B1 y la prodelfinidina tipo A [24]. Aunque numerosos sistemas analíticos basado en la espectrometría de masas como LC-MS, HPLC-DAD-FLD-MS/MS, HPLC-DAD-ESI-MS/MS, UHPLC-DAD/ESI-Q-TOF e incluso HPLC-RMN se han utilizado para la detección y cuantificación de compuestos fenólicos en sarmientos de vid [48], previo a la presente tesis doctoral no se había reportado ningún trabajo que utilizará un enfoque mediante un sistema analizador de masas de alta resolución como LTQ-Orbitrap-MS. El uso de esta poderosa herramienta analítica permitió identificar compuestos fenólicos no reportados previamente en los extractos de sarmientos de vid [16] (Ver capítulo 3.1).

1.3 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DESDE SARMIENTOS DE VID.

La composición fenólica de los sarmientos de vid se encuentra fuertemente influenciada por factores como: el tipo de cultivar [49–51], la zona geográfica de crecimiento [52], el tiempo y condiciones de almacenamiento de los sarmientos posteriores a la poda [51,53–55]. Por su parte, los rendimientos de extracción de los compuestos fenólicos dependen de los métodos y variables de extracción empleadas para su recuperación como son: el tamaño de partícula de los sarmientos, el tipo de disolvente utilizado, la temperatura y tiempos de extracción; al igual que de factores como el pH y la presencia de luz que afectan a la estabilidad de los compuestos extraídos [32]. A continuación, se presenta un detallado resumen de las principales variables que afectan el perfil fenólico de los sarmientos de vid.

1.3.1 Diferencia en la composición fenólica entre cultivares.

La composición y concentración de compuestos fenólicos y principalmente estilbenos se encuentra muy relacionada con aspectos concernientes al tipo de cultivar y sus condiciones de crecimiento y estrés biótico y abiótico. Numerosos estudios han reportado el nivel de estilbenos presentes en sarmientos de diferentes especies del género *Vitis* como: *V. amurensis*, *V. arizonica*, *V. berlandieri*, *V. betulifolia*, *V. X champinii*, *V. cinérea*, *V. coignetiae*, *V. davidii*, *V. doaniana*, *V. heyneana*, *V. flexuosa*, *V. labrusca*, *V. mustangensis*, *V. pentagona*, *V. riparia*, *V. ruperstris*, *V. thunbergii* y *V. vinífera* [48]. Debido a su importancia económica y amplia distribución mundial la extracción de compuestos fenólicos desde la especie *V. vinífera* es la más reportada.

En este sentido, Lambert et al. [50] comparó el perfil de estilbenos en sarmientos de 16 tipos distintos de cultivos de *V. vinífera* de gran importancia comercial, demostrando que el contenido y tipo de estilbeno presente en los sarmientos es altamente dependiente del tipo de cultivar extraído. Altos niveles de *E*-resveratrol (1526 mg/kg) y *E*- ϵ -viniferina (3737 mg/kg) fueron obtenidos desde sarmientos de la variedad Pinot Noir. Estos resultados coinciden con lo previamente descrito por Vergara et al. [52], que para la misma variedad reportó un alto y variable contenido de *trans*-resveratrol (723 - 5590 mg/kg). Esta concentración dependía también del lugar o zona geográfica de crecimiento del cultivo. Además, en este mismo trabajo se reportó por primera vez, un

incremento de un 35% en los niveles de resveratrol en la variedad Pinot Noir después de un almacenamiento de 2 meses posterior a la poda, añadiendo una nueva e importante variable en el estudio de los estilbenos en sarmientos de vid.

1.3.2 Condiciones de almacenamiento posteriores a la poda.

Numerosos estudios han demostrado el incremento en los niveles de estilbenos en sarmientos posterior a la poda [23,51,53–58]. La poda de los sarmientos genera un estrés mecánico en la madera de la vid, que induce una expresión de los genes de fenilalanina amonio liasa y la estilbeno sintasa que codifican enzimas claves en la ruta biosintética de los estilbenos [54]. En este mismo sentido, las variables como la longitud del sarmiento, el tiempo y temperatura de almacenamiento influyen directamente en la acumulación de estilbenos en los sarmientos [54,55]. Por lo tanto, las condiciones de guarda posteriores a la cosecha de los sarmientos son parámetros claves para incrementar los rendimientos de extracción de estilbenos con miras a una explotación industrial.

Un sistema para aumentar el contenido de estilbenos en sarmientos de poda de vid fue patentado en el año 2014 (Ver capítulo 8.2.1). El sistema reivindica las condiciones de almacenamiento de los sarmientos durante un período que comprende los 90 - 150 días, a una temperatura de entre 20 – 30°C, humedad de entre el 30 - 70%, y una intensidad lumínica entre 0.1 – 15 lux [57]. Mediante este método un aumento significativo de estilbenos totales de hasta 5 veces fue observado en sarmientos de la variedad Pinot Noir [53]. Posteriormente, otro estudio analizó el aumento de estilbenos durante 30 meses, se observó que los sarmientos de la variedad Pinot Noir llegan a un máximo de *trans*-resveratrol en un período de 6 meses, luego de este período la concentración comienza a disminuir significativamente manteniéndose prácticamente constante hasta los 30 meses de estudio [56].

La temperatura de almacenamiento también juega un rol clave en el incremento de la concentración de estilbenos monoméricos (*E*-resveratrol y *E*-piceatannol). Houillé et al. [55] reporta un aumento de hasta 40 veces de *E*-resveratrol durante las primeras seis semanas de almacenamiento a una temperatura de 20°C, indicando que la temperatura óptima de aumento en la concentración de *E*-resveratrol se encuentra en el rango de 15 a 20 °C. Este estudio además concluye que el aumento de resveratrol se debe a una biosíntesis *de novo* que resulta por la inducción en la expresión de la estilbeno sintasa durante las primeras semanas de almacenamiento. Este aumento en el estímulo del

metabolismo de los estilbenos monoméricos estaría provocado por el estrés mecánico que sufre la vid al momento de ser podada.

La longitud del corte también parece ser un factor clave en el incremento de *E-resveratrol* y *E-piceatannol* postcosecha. Una longitud de 0.5 cm y un almacenamiento durante 2 semanas permitiría incrementar los niveles de *E-resveratrol* y *E-piceatannol* en sarmientos en un corto período de tiempo. Sin embargo, en este mismo estudio, se observó que por debajo de 1 cm los niveles de transcripción de los genes biosintéticos (PAL y STS) de estilbenos disminuyeron. Por lo tanto, un corte de sarmientos por debajo de 1 cm podría inducir muerte celular y generar un efecto adverso en la acumulación de estilbenos [54]. Por otro lado, además de resveratrol un incremento significativo en la concentración de otros compuestos fenólicos como la catequina, ácido elágico, ϵ -viniferin y el ácido ferúlico fue observado luego de un almacenamiento de 6 meses posterior a la poda [23].

Otros sistemas como la aplicación de metiljasmonato, un elicitor de estilbenos, también se ha utilizado como estrategia efectiva para el incremento de *trans-resveratrol* y *trans- ϵ -viniferina*, resaltando la importancia del incremento de compuestos objetivo durante el período posterior a la poda de los sarmientos [58].

Finalmente, en sarmientos de 44 variedades de uva europeas, se analizó el contenido de los siguientes polifenoles: catequina, epicatequina, *E-resveratrol*, *E-piceatannol*, *E-viniferina*, *E-miyabenol C*, ampelopsina A, *E-vitisina B*, hopeaphenol e isophopeaphenol, utilizando un tratamiento postcosecha que comprendía el corte de los sarmientos en una longitud de 0.5 cm, almacenamiento a 20 °C durante 2 semanas de guarda. El estudio concluyó, que la aplicación del sistema de almacenamiento postcosecha, permitió un aumento en el contenido de compuestos fenólicos estudiados en un valor promedio cercano al 56%. Además, del almacenamiento, y como se ha mencionado previamente, el perfil fenólico dependió en gran medida de la variedad del cultivar analizado. En este sentido, Pinot Noir es uno de los 10 cultivares más extendidos en todo el mundo con 112,000 ha plantadas, constituyéndose como una promisorio fuente de biomasa para la extracción y obtención de estilbenos [51].

Todas las investigaciones antes señaladas, resaltan la importancia de las condiciones de almacenamiento posteriores a la poda de los sarmientos de vid. La viabilidad técnico-económica de estas condiciones de almacenamiento también deben evaluarse a la hora de proyectar una producción industrial. En este sentido, largos tiempos de almacenamiento o tamaños de corte muy específicos serían difícilmente reproducibles a

escala industrial. Por lo tanto, tal como se menciona en la patente del capítulo 8.2.1 [57], el almacenamiento de los sarmientos de vid en tamaños similares a los cosechados tradicionalmente, durante un período de máximo 3 meses, a una temperatura (20 - 30°C) y humedad ambiente (30 – 70%), se mantienen como condiciones aplicables a contextos industriales.

1.3.3 Métodos y condiciones de extracción de sarmientos.

La extracción sólido-líquido es uno de los métodos más utilizados para la recuperación de compuestos fenólicos desde sarmientos de vid. Lo anterior, es debido a que estos procesos son de fácil operación y bajo costo de inversión [48], además de ser métodos escalables con posibilidades de ser adoptados por empresas productivas a mediana y gran escala. Sin embargo, en los últimos años tecnologías de extracción emergentes como las extracciones asistidas por ultrasonido y microondas, altas presiones, campos eléctricos pulsados y descargas eléctricas de alto voltaje; calentamiento óhmico, autohidrólisis, entre otras, se han utilizado para la recuperación de compuestos fenólicos desde sarmientos. A continuación, se presenta un resumen de los distintos métodos y condiciones utilizados para la extracción de compuestos fenólicos desde sarmientos de vid.

1.3.3.1 Método convencional: Extracción sólido-líquido.

La extracción sólido-líquido a escala de laboratorio es el método de recuperación de compuestos fenólicos más reportado. Luque-Rodríguez et al. [59] fueron pioneros en estudiar la influencia de los parámetros de extracción como temperatura, tiempo y porcentaje de etanol en la extracción de compuestos fenólicos desde sarmientos de vid utilizando mezclas de etanol/agua sobrecalentadas. Las mejores condiciones de extracción encontradas para la obtención de fenoles totales fueron etanol a 80% (v/v), temperatura de 240 °C y tiempo de 60 minutos. Además, observaron una mejora en los rendimientos de extracción al disminuir el pH. Bajo las mismas condiciones de extracción, pero a una temperatura menor (120 °C) y un pH de 3, observaron altos niveles de ácido gálico (470 mg/kg), ácido protocatechico (379 mg/kg) y ácido siríngico (110 mg/kg). Este trabajo, desarrollado a escala de laboratorio, demostró tempranamente las ventajas de rendimiento en la extracción de compuestos fenólicos mediante el empleo de líquido sobrecalentado por sobre la extracción sólido-líquido convencional realizada a temperatura ambiente. Sin embargo, este estudio no se centró

en la obtención de estilbenos, que a la postre serían los compuestos más estudiados en sarmientos de vid.

Posteriormente, en el año 2008, Rayne et al.[60] propusieron concretamente la extracción de *trans*-resveratrol y *trans*-viniferina usando como materia prima sarmientos de la variedad Pinot Noir. En este trabajo también se establece que las soluciones etanol/agua 80:20 (v/v), como las más adecuadas para la extracción de estilbenos. Este proceso se realizó a temperatura ambiente (20-25°C) durante 30 minutos y se obtuvieron altos rendimientos de resveratrol (3400 mg/kg) y viniferina (1300 mg/kg). Parte de este mismo grupo de investigación, en el mismo año, comprobaron que la temperatura de hasta de 83.6 °C y una concentración de etanol entre 50-70% permitían obtener rendimientos más altos para *trans*-resveratrol (4250 mg/kg), *trans*- ϵ -viniferina (2030 mg/kg) y fenoles totales (9280 mg/kg). Cabe destacar que este es el primer trabajo que se realiza a una escala de banco, superior a la de laboratorio, utilizando un vaso de precipitados de 4 L [61]. En la misma línea de escalamiento de extracciones, Riquelme et al. [8], optimizan las condiciones de extracción a una escala de banco, utilizando reactores de acero inoxidable de 1 a 7 L (Ver capítulo 8.1.3). Estos reactores (tipo Parr) cuentan con sensores de temperatura, y poseen un diseño similar a los reactores industriales por lo que son útiles en estudios de escalamiento. La extracción en este trabajo se llevó a cabo utilizando sarmientos de la variedad Pinot Noir, recolectados en un viñedo orgánico (Viña de Neira), región del Bio-Bio Chile, que corresponde al mismo sitio de recolección de los sarmientos utilizados en los artículos de la presente tesis doctoral. Además, previo a la extracción, los sarmientos fueron almacenados por 3 meses a 19 ± 5 °C y 70% de humedad, de acuerdo con la patente descrita anteriormente (Ver capítulo 8.2.1). El trabajo concluye que las mejores condiciones de extracción fueron el uso de etanol/agua 80:20 (v/v), una relación entre sólido/líquido de 1:10, una temperatura de 80°C, un tiempo de 100 minutos y un tamaño de partícula de los sarmientos menores a 1 cm. Cabe señalar que este estudio se utilizó como base para la extracción a escala piloto de 750L (Ver capítulo 3.2).

Aunque otras condiciones de extracción son utilizadas para la recuperación de compuestos fenólicos desde sarmientos de vid, mezclas de etanol/agua y altas proporciones de etanol son las más empleadas. Por su parte, temperaturas cercanas a los 80 °C parecen tener un efecto positivo en la extracción de resveratrol y viniferina, mientras que se evita superar los 100 °C para no provocar la degradación de resveratrol (105 °C) y viniferina (140 °C) [32]. Por otro lado, el tiempo de extracción es altamente

dependiente del solvente y temperatura elegidas, aunque tiempos de entre 30 a 100 minutos son los más adecuados y utilizados. El tiempo de extracción también es un factor clave para proyectar una producción industrial, ya que elevados tiempos de extracción pueden ver disminuida la productividad de la planta en términos de producto/hora y por consiguiente volver el negocio menos rentable.

1.3.3.2 Nuevas tecnologías de extracción: Extracción Asistida por ultrasonido.

La extracción asistida por ultrasonido es otro de los métodos de laboratorio más reportados para recuperar compuestos fenólicos desde sarmientos de vid. Entre ellos, uno de los métodos más empleados es el de Vergara et al. [52]. En este trabajo, se utilizaron sarmientos de diferentes variedades, incluyendo la variedad Pinot Noir, recolectadas en diferentes sectores geográficos del sur de Chile. Estas muestras además fueron almacenadas entre 2 a 4 meses, con la finalidad de aumentar el contenido de estilbenos totales. Las condiciones de extracción fueron: 2g de sarmientos extraídos en 16 mL de solvente etanol/agua 80:20 (v/v), y se utilizó una barra ultrasónica con una frecuencia de 50 Hz a temperatura ambiente. Además, se optimizaron las etapas de extracción encontrándose que un 95% del total de estilbenos se recuperaban luego de 4 etapas de extracción. En este trabajo se observaron altos niveles de resveratrol (3676 mg/kg) y menores de viniferina (700 mg/kg). El mismo método fue utilizado por Gorena et al. [53], que para la variedad Pinot Noir reportó similares niveles de resveratrol (3773 mg/kg) y viniferina (656 mg/kg). Posteriormente, Sáez et al. [17], utilizando la misma metodología y cultivar, observó esta vez mayores niveles de viniferina (1474 mg/kg) y similares niveles de resveratrol (3704 mg/kg). Una tendencia similar fue descrita por Ewald et al. [56], quien obtuvo aún mayores niveles de viniferina (2790 mg/kg) y menores niveles de resveratrol (1908 mg/kg). Por lo tanto, aunque se utilice el mismo cultivar, las diferencias dadas por los sitios de recolección, condiciones de almacenamiento posteriores a la poda y el empleo de distintas metodologías analíticas influyen directamente en las concentraciones de los compuestos objetivo.

Una extracción asistida por ultrasonido a escala piloto fue llevada a cabo recientemente por Dorosh et al. [36]. La extracción se realizó utilizando 30g de sarmientos de las variedades Touriga Nacional y Tinta Roriz, las que fueron extraídas en 1500 mL de etanol/agua 50:50 (v/v) mediante un procesador ultrasónico IncBio de 3 KW y 20 Hz. Los mayores niveles de compuestos fenólicos (26000 mg/kg) y una alta actividad

antioxidante para eliminar radicales libres (DPPH: 33.4 mg equivalentes Trolox (TE)/g) fue observada en la extracción a escala piloto. En este trabajo se menciona que la cantidad de compuestos fenólicos no disminuyó sustancialmente a escala piloto, lo que les permitiría obtener mayores cantidades de extracto con el mismo tiempo de extracción aplicado a escala de laboratorio.

1.3.3.3 Nuevas tecnologías de extracción: Extracción Asistida por Microondas.

La extracción asistida por microondas también se ha propuesto como un método de recuperación alternativo para la obtención de compuesto fenólicos desde sarmientos de vid. En el año 2012, Delgado-Torre et al. [62], fueron los primeros en proponer una extracción asistida por microondas para la recuperación de compuestos fenólicos desde sarmientos. Esta extracción fue comparada con extracción de líquido sobrecalentado y extracción asistida por ultrasonido, buscando maximizar el contenido de compuestos fenólicos totales. La extracción asistida por microondas se realizó utilizando 1g de sarmientos molidos en un recipiente de extracción que contenía 20 mL de etanol/agua 80:20 (v/v) a pH 3, y se aplicó una energía auxiliar de potencia de irradiación de 140 W durante 5 minutos. Los investigadores mencionan que la extracción asistida por microondas muestra valores más bajos de compuestos fenólicos totales, indicándose que la extracción de líquido sobrecalentado fue la más adecuada para la recuperación de compuestos fenólicos. Similarmente, Sánchez-Gómez et al. [63], comparan la extracción asistida por microondas con las extracciones sólido-líquido convencional y dinámica utilizando el reactor Naviglio[®], que genera un efecto de compresión y descompresión con agua a temperatura ambiente. La extracción por microondas se realizó utilizando 50g de sarmientos molidos en un reactor de 250 mL a 100°C, a una potencia de 600 W durante 5, 10 y 15 minutos. La extracción por microondas fue descartada tempranamente por los investigadores que continuaron con el análisis comparativo de la extracción sólido-líquido convencional y dinámica (Naviglio[®]), y nuevamente se reportó que la extracción convencional mostraba niveles más altos de flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenos. En otro trabajo Soral et al. [64], también comparan varios métodos de extracción para obtener estilbenos (resveratrol, viniferina y r2-viniferina) a partir de sarmientos de la variedad Cabernet Moravia. Los métodos estudiados incluyeron la extracción asistida por microondas, maceración a temperatura de laboratorio, extracción a temperatura elevada, extracción en lecho fluidizado, extracción Soxhlet y extracción asistida por solvente acelerado. Para la extracción por

microondas a una potencia de 150 W se utilizó 1.5g de sarmiento en polvo en 50 mL de metanol, a un tiempo inicial de 20 minutos y una retención de 10 minutos. Bajo estas condiciones, se obtuvieron aceptables niveles de resveratrol (5506 mg/kg), viniferina (1963 mg/kg) y r2-viniferina (418 mg/kg). Sin embargo, los mayores niveles de recuperación para resveratrol (6030 mg/kg) y viniferina (2260 mg/kg) fueron obtenidos bajo extracción acelerada por solvente utilizando metanol. Aunque las tres investigaciones antes mencionadas muestran desventajas en el uso de la extracción de microondas en comparación con otros métodos, incluyendo una clara ventaja de los métodos convencionales sólido-líquido, otros tres estudios recientes determinaron que su mayor ventaja sería la reducción en los tiempos de extracción.

Piñeiro et al. [65] desarrollan un diseño experimental factorial para optimizar las variables de extracción por microondas. Las variables estudiadas fueron: solvente, agitación, temperatura y tiempo de extracción, potencia de microondas, peso de la muestra y volumen de extracción. Las condiciones óptimas de extracción encontradas fueron una temperatura de extracción de 125 °C, una potencia de microondas de 750 W, tiempo de extracción de 5 minutos, solvente de extracción etanol/agua 80:20 (v/v) en una alta proporción muestra-solvente de entre 1:100 y 1:125. Aunque por una parte los investigadores destacan que el bajo tiempo de extracción empleado; por otro lado, la alta proporción de solvente encontrada como óptima sería una limitante en el escalamiento de estas condiciones de extracción. Además, los resultados comparativos con una extracción sólido-líquido de referencia que utilizaba acetona/agua (6:4), realizada a temperatura ambiente durante toda la noche, mostraron un mismo orden de magnitud en las concentraciones de los estilbenos analizados (resveratrol y viniferina). Similarmente, Moreira et al. [66], comparan los métodos de extracción por microondas, agua subcrítica y extracción convencional para la recuperación de compuestos fenólicos desde sarmientos de las variedades portuguesas Touriga Nacional y Tinta Roriz. Los extractos más concentrados fueron obtenidos mediante la extracción asistida por microondas y la extracción con agua subcrítica, realizada en un reactor de 1.7 L, empleando agua como solvente y una temperatura de 150°C, tiempo de 40 minutos y una presión de 40 bar. La extracción por microondas se realizó utilizando 0.1g de sarmientos molidos en 20 mL de etanol/agua 60:40 (v/v), durante 20 minutos a 100°C. Aunque los investigadores concluyen que la extracción por microondas es la que permite obtener un mayor contenido de fenoles totales (32100 mg/kg), el contenido máximo de flavonoides (18700 mg/kg) fue reportado para la extracción con agua

subcrítica, por lo que ambas extracciones son definidas como adecuadas para la recuperación de compuestos fenólicos. Incluso los resultados más altos de actividad antioxidante medidos por los ensayos FRAP y DPPH fueron también encontrados en la extracción con agua subcrítica, mostrando nuevamente las ventajas de las extracciones sólido-líquido por sobre la extracción asistida por microondas.

Finalmente una optimización y comparación entre la extracción asistida por microondas y la extracción sólido-líquido mediada por temperatura fue llevada a cabo y publicada recientemente por Jesus et al. [67]. Las mejores condiciones de extracción asistida por microondas fueron a 120°C, durante 5 minutos, que les permitió recuperar una cantidad ligeramente mayor de compuestos fenólicos totales (23700 mg/kg), que la extracción convencional (21700 mg/kg). Los investigadores mencionan que, aunque la extracción por microondas se utiliza con éxito a escala de laboratorio, el número de aplicaciones industriales es aún muy limitado. Por lo tanto, si bien la extracción por microondas muestra reducciones en los tiempos de proceso, no ha logrado mostrar resultados claramente superiores en los rendimientos de extracción de compuestos fenólicos.

1.3.3.4 Nuevas tecnologías de extracción: Autohidrólisis.

Un proceso de autohidrólisis en dos etapas secuenciales para la valorización integral de los sarmientos de vid fue propuesto por Jesus et al. [68]. Se utilizaron sarmientos molidos (8 mm) y el proceso de autohidrólisis se llevó a cabo en un reactor de acero inoxidable de 160 mL. La primera etapa de autohidrólisis se realizó bajo un tratamiento a 180°C durante 60 minutos y una proporción de líquido/sólido de 6 g agua/6g sarmientos. Una segunda etapa de autohidrólisis se llevó a cabo a una temperatura en el rango de 180-200 °C y un tiempo de 30-40 minutos. Los compuestos fenólicos identificados en el licor de autohidrólisis fueron principalmente ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. Se identificaron otros flavonoides como la catequina, hesperidina y rutina y solo un estilbeno, el resveratrol que fue observado en bajos niveles (79 mg/kg). El proceso integral permitió obtener una alta concentración de oligosacáridos y los investigadores mencionan que para 100 kg de sarmientos se pueden producir 13.6 kg de xilooligosacáridos, 27.0 kg de lignina, 13.1 kg de etanol y 3.1 kg de compuestos fenólicos. Similarmente Gullón et al. [69], describen un proceso de autohidrólisis no isotérmica de sarmientos y obtienen una producción máxima de xilooligosacáridos (99000 mg/kg) a 200°C. Los mismos investigadores anteriores, Gullón et al. [70], realizan un proceso de autohidrólisis de sarmientos que incluía un paso adicional de

extracción con acetato de etilo obteniendo altos niveles de extracción de compuestos fenólicos totales (38000 mg/kg), flavonoides (9200 mg/kg) empleando altas temperaturas de extracción (215°C). Por lo tanto, la autohidrólisis parece ser un método eficiente para recuperar la fracción no fenólica de los sarmientos y particularmente adecuada para la producción de oligosacáridos.

1.3.3.5 Nuevas tecnologías de extracción: Extracción mediante fluido supercrítico y líquido a presión.

La extracción mediante fluido supercrítico y líquido a presión como métodos analíticos para la extracción de estilbenos es propuesta por Zachová et al. [71]. Los resultados fueron comparados con una extracción etanólica mediante Soxhlet. Los rendimientos de la extracción de estilbenos por líquido a presión a 10 MPa con una temperatura de entre 80 a 100°C fueron levemente más altos que Soxhlet, aunque se observó una degradación térmica de la r2-viniferina por encima de los 100°C. Por su parte, la extracción de fluidos supercríticos con CO₂ a 30 MPa mostró niveles de recuperación de viniferinas menores a la extracción Soxhlet y requirió el empleo de etanol como cosolvente para aumentar las recuperaciones de estilbenos. En general estos métodos presentan algunas ventajas sobre los convencionales por ser rápidos, selectivos y utilizar solventes respetables con el medio ambiente como el CO₂. Sin embargo, para la recuperación de compuestos fenólicos requieren el uso de etanol como cosolvente, al igual que la extracción sólido-líquido convencional. Por otro lado, sus elevados costos de operación por consumo energético y la necesidad de operarios altamente calificados limitan el uso de estas técnicas escala industrial.

1.3.3.6 Nuevas tecnologías de extracción: Extracción por campos eléctricos pulsados (PEF), descargas eléctricas de alto voltaje (HVED) y calentamiento óhmico.

La aplicación de PEF y HVED fue estudiada como método de extracción para la recuperación de compuestos fenólicos desde sarmientos de vid. En un primer trabajo, Rajha et al. [72], utilizan estos métodos para la extracción de compuestos fenólicos y proteínas. El método de HVED mostró mayores rendimientos de polifenoles (3450 mg/kg) utilizando una menor cantidad de energía (10 kJ/kg). El procedimiento permitió aumentar el coeficiente de difusión de los polifenoles, debido al daño celular y estructural en el tejido de los sarmientos. Sin embargo, se observaron bajos niveles de compuestos fenólicos individuales kaempferol (213 mg/kg), epicatequina (2459 mg/kg)

y resveratrol (414 mg/kg). Más tarde, los mismos investigadores utilizaron este método, seguido de un proceso de purificación por ultrafiltración con membranas. Aunque se demostró que los extractos obtenidos por HVED eran aptos para el proceso de ultrafiltración, al menos un 8% de compuestos fenólicos se depositaban en las membranas lo que provocó una reducción en su rendimiento global [73]. Posteriormente continuaron con su investigación, estudiando el efecto mecánico y químico de las HVED, y comprobaron que el proceso provoca una fragmentación de los sarmientos, mientras que la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado por las descargas eléctricas no degrada a los compuestos fenólicos presentes en los sarmientos manteniéndose estables hasta una energía de 609.5 kJ/kg [74]. Un sistema similar de extracción utilizando campos eléctricos bajos e intermedios para una extracción óhmica fue recientemente propuesto por Jesus et al. [75]. Se utilizó un campo eléctrico bajo (496 V/cm) y un campo eléctrico intermedio (840 V/cm), la extracción se realizó en una solución de etanol/agua 45% (v/v) a 80°C a distintos tiempos de extracción entre 20 a 90 minutos. El uso de un campo eléctrico permitió obtener mayores niveles de compuestos fenólicos, y mejores actividades antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas. No cabe duda de que los métodos de extracción por campos eléctricos son novedosos e interesantes. Sin embargo, no han logrado mostrar resultados de rendimiento de extracción de compuestos fenólicos consistentemente superiores a los métodos convencionales.

1.3.3.7 Nuevas tecnologías de extracción: Limitaciones de las nuevas tecnologías.

Las tecnologías de extracción convencionales y emergentes presentan ventajas y desventajas con respecto a sus costos de implementación y operación. Al parecer aún existen barreras tecnológicas asociadas a estos métodos de extracción emergentes. La principal ventaja de las extracciones emergentes es la reducción en los tiempos de extracción. Sin embargo, las nuevas metodologías de extracción también emplean altas cantidades de solvente. Al mismo tiempo, el alto costo de energía utilizado por estos sistemas debe ser evaluado a la hora de proyectar un escalamiento de estos procesos [32]. Actualmente, la extracción sólido-líquido es la más empleada y estudiada, ya que es económica y rápida de implementar y está disponible en la mayoría los laboratorios [48]. De todas formas, pocos estudios de extracción sólido-líquido de sarmientos se han realizado a escala piloto o mayor y mucho menos se conoce el efecto del escalamiento en el perfil individual de los compuestos fenólicos (Ver capítulo 3.2).

1.4 ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

La tecnología de microencapsulación surge en la década de los 30`, aunque no es hasta los años 50` que se producen las primeras aplicaciones a escala industrial. Hoy en día esta técnica se utiliza ampliamente en diferentes industrias como la farmacéutica, cosmética, agroquímica y alimentaria. Particularmente, en esta última se ha utilizado para la fabricación de compuestos funcionales, aditivos, colorantes y saborizantes [76].

La encapsulación es una tecnología en la que una o más partículas sólidas, líquidas o gaseosas quedan atrapadas y rodeadas dentro de una matriz por un material de recubrimiento. Esta matriz puede ser sólida o líquida, homogénea o heterogénea y de tamaño microscópico a macroscópico [76]. El/los compuestos que se encapsulan se denominan “activo”, “núcleo”, “fase interna” o “relleno”, mientras que el material que forma la matriz se denomina “pared”, “agente encapsulante”, “caparazón”, “portador” o “material de membrana” [76,77].

Las cápsulas se pueden clasificar según su tamaño en macrocápsulas ($>5000\ \mu\text{m}$), microcápsulas ($>1\ \mu\text{m}$ y $<5000\ \mu\text{m}$) y nanocápsulas ($<1\ \mu\text{m}$). En relación con su estructura las microcápsulas pueden ser regulares o irregulares con formas esféricas, tubulares y ovaladas. Además, existe una enorme variedad de materiales que pueden ser utilizados como agentes de recubrimiento incluyendo polímeros sintéticos, semisintéticos y naturales. La encapsulación de compuestos fenólicos se ha llevado a cabo con numerosos materiales de pared como células de levadura, mezclas de alginato y quitosano, proteínas, goma arábiga, maltodextrina y ciclodextrinas [76]. Particularmente, estas últimas son una de las más utilizadas para la encapsulación de compuestos fenólicos [78]. Por otro lado, existen numerosos métodos de microencapsulación, los que pueden dividirse en procesos químicos (polimerización interfacial e *in situ*); procesos fisicoquímicos como la coacervación (separación de fases), emulsificación; y procesos físico-mecánicos como el método de suspensión de aire, recubrimiento en bandeja, recubrimiento en lecho fluidizado, enfriamiento y secado por aspersión. Este último es uno de los métodos más utilizados para la encapsulación de compuestos fenólicos [76].

1.4.1 Secado por aspersión

El secado por aspersión (*Spray-drying*) es un método físico-mecánico desarrollado en los años 30` y se ha utilizado en la industria alimentaria desde la década de los 50`

[76,79]. Actualmente, es una técnica muy utilizada por la industria alimentaria para transformar líquidos en polvos estables he incluso se estima que cerca del 90% de los productos microencapsulados se preparan mediante este método [80]. El secado por aspersión es también una técnica simple, rápida, flexible, con bajos costos de operación y fácil de escalar. Además, permite la producción industrial en un modo continuo, con una alta eficiencia de encapsulación, una buena estabilidad y fácil manejo del producto final. Es importante destacar que a nivel industrial existen una gran disponibilidad de equipos y se considera como una tecnología limpia, ya que en la mayoría de los casos no requiere el uso de solventes orgánicos [76]. Esta tecnología es aplicable a una amplia gama de productos alimentarios incluyendo saborizantes, colorantes, vitaminas, minerales, grasas y aceites y permite prolongar la vida útil de los productos frente a condiciones ambientales [81]. Este método tiene la capacidad de disminuir la actividad del agua, evitar procesos de degradación, asegurar la estabilidad microbiológica, mejorar la solubilidad del producto final y reducir sus costes de almacenamiento y transporte [76].

El proceso de secado por aspersión comúnmente implica disolver, emulsionar o dispersar los compuestos activos para luego ser atomizados, pulverizados, separados y recuperados [76,80]. De acuerdo con Ribeiro et al. [76] el proceso puede ser dividido en 5 etapas:

1. Preparación de la solución de alimentación, esta etapa implica disolver, emulsionar o dispersar los compuestos activos, en una solución concentrada como vehículo.
2. Atomización de la solución, que implica la formación de gotas con un diámetro de pocas micras.
3. Pulverización de las gotas deshidratadas en microcápsulas en la cámara calentada por aire del secador (generalmente a una temperatura entre 160 – 220 °C).
4. Separación de las microcápsulas en el ciclón mediante aire a una temperatura más baja (generalmente entre 50 – 80°C).
5. Recuperación final de las microcápsulas.

El método de secado por atomización permite obtener un amplio rango de eficiencia de encapsulación el que generalmente varía entre 10 a 90%. La eficiencia de encapsulación (EE) depende de muchas variables relacionadas a las condiciones del proceso de secado, el tipo de atomización, los niveles de humedad, el flujo del aire y su temperatura de entrada y salida, entre otras. Además, la EE, depende de la composición y propiedades

del material de pared, de las características del núcleo o compuestos activo y la relación de masa entre este último y el material de pared [76]. Como se mencionó anteriormente para la encapsulación de compuestos fenólicos existe una alta gama de compuestos utilizados como material de pared, particularmente las ciclodextrinas son una de las más empleadas.

1.4.2 Encapsulamiento mediante Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CD) fueron descubiertas en 1891 por el científico francés Villiers, quién aisló una sustancia cristalina desde almidón la que denominó “celulosina” $[(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O]$ debido a su similitud con la celulosa y porque resistía la hidrólisis ácida y mostraba falta de propiedades reductoras [82–84]. Más tarde en 1903 el microbiólogo austriaco Franz Schardinger, describió dos compuestos cristalinos que fueron aislados de la digestión bacteriana del almidón de patatas y los identificó como las “celulosina” de Villiers. Sin embargo, en su artículo describe que “dextrina cristalina” era un mejor nombre para este tipo de compuestos. De esta forma su nombre cambió a α -dextrina y β -dextrina, conociéndose también como las CD de Schardinger en su honor. Además Schardinger planteó la hipótesis de que las CDs eran compuestos oligosacáridos macrocíclicos, proporcionando con ello las bases químicas de las ciclodextrinas [83,84]. Las estructuras cristalinas de α - y β -CD fueron determinadas por primera vez mediante difracción de rayos X en 1942, mientras que la estructura de la γ -CD fue descrita en 1948 [82,85]. Más tarde en 1954, Cramer en su libro “Complejos de inclusión (*Einschlussverbindungen*)”, presenta todas las características fisicoquímicas de la α -, β - y γ -CDs, describiendo su estructura química, tamaño de la cavidad, solubilidad, reactividad y sus capacidades de formar complejos y contribuir en la estabilidad química de las moléculas huésped [84,86].

Las CDs son moléculas química y físicamente estables que se producen por la modificación enzimática del almidón mediada por la enzima CD glucanotransferasa (CGTasa), que produce una mezcla de CD que incluyen a la α -, β - y γ -CD que poseen seis, siete u ocho unidades de glucopiranosas unidas por enlaces α -(1,4) [81,82]. Físicamente las CDs consisten en un macrociclo con forma de cono truncado con una superficie exterior hidrófila y una cavidad interior relativamente hidrófoba. Esta característica estructural les permite formar complejos de inclusión con una amplia gama de moléculas huéspedes a partir de interacciones no covalentes, como fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófobas y enlaces de hidrógeno [83,87].

Las CDs (α -, β - y γ -) se han clasificado como aditivos alimentarios generalmente reconocidos como seguros (GRAS) según la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) [81,83,87,88]. Por otro lado, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), asignó una ingesta diaria aceptable de 5mg/kg peso corporal por día para el aditivo β -CD (E 459) en 1996, lo que fue rectificado en una re-evaluación en el año 2016 [89]. Entre las CDs naturales la β -CD es la más utilizada, accesible y de menor precio [87], representando cerca de un 97% de las CDs utilizadas en el mercado [80,90]. Sin embargo, la β -CD es al menos nueve veces menos soluble que la α -CD y la γ -CDs por esta limitada solubilidad se impulsó el desarrollo de algunos derivados de CDs altamente solubles en agua [80]. De esta forma la adición del grupo hidroxipropilo a la β -CD, originó la 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), que posee una solubilidad 27 veces mayor que el compuesto original [88]. La HP- β -CD es la CDs menos tóxica y es bien tolerada en seres humanos, lo que se ha demostrado mediante estudios clínicos que no muestran efectos adversos en el riñón en dosis menores a 16g/día [91,92]. La HP- β -CD fue el primer derivado de CD aprobado como un ingrediente farmacéutico inactivo por la FDA [83,93], incluso es adecuada tanto para la administración oral como intravenosa en una concentración máxima de 1.5% (v/v) [93]. Además, la HP- β -CD se encuentra en el listado de la farmacopea europea (Ph.Eur.) y de EE.UU (USP/NF), así como en el Codex Farmacéutico Japonés (JPC) [84].

Se ha publicado extensa literatura científica relativa a la encapsulación de compuestos fenólicos mediante CDs, como propuestas de aplicación en los ámbitos farmacéuticos y alimenticios. Como se mencionó anteriormente, las CDs pueden servir como vehículos para la protección de compuestos fenólicos debido a su capacidad de encapsulación mediada por un proceso que implica la formación de un complejo de inclusión [78].

1.4.3 Formación y análisis de los complejos de inclusión

Los complejos de inclusión son el resultado de una interacción química que ocurre entre una molécula huésped y la cavidad hidrofóbica de las CDs. La capacidad de las CDs de formar complejos de inclusión está mediada por interacciones no covalentes que incluyen fuerzas impulsoras como: interacciones electrostáticas, de van der Waals, hidrófobas, enlaces de hidrógeno e interacción de transferencia de carga [94]. Las fuerzas de van der Waals, las interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógeno mantienen las uniones entre las CDs y sus moléculas huésped. La estabilidad de estos

enlaces es generalmente es débil, por su parte la energía del enlace de hidrógeno va desde 10 a 40 kJ/mol, mientras que el de las fuerzas de van der Waals varían entre 0.5 a 4 kJ/mol. Sin embargo, los complejos de inclusión pueden lograr una estabilidad proporcional mayor e incluso similar a la de un enlace covalente (100 a 400 kJ/mol), debido a la disposición espacial e interacción de la CD y el huésped [90]. Varios estudios sugieren que después de la formación de los complejos de inclusión, la parte más hidrófoba de la molécula huésped es la que se incluye preferentemente en la cavidad de las CDs, por lo que se maximiza el contacto entre sus grupos hidrófobos y la cavidad apolar de la CDs [95]. Tanto la polaridad como la carga de las moléculas huéspedes influyen en la interacción CDs-huésped, aunque esta característica sería menos relevante que el ajuste geométrico. Particularmente las moléculas neutras muestran mayor facilidad de generar complejos que sus contrapartes ionizadas [90].

En general los complejos de inclusión se representan entre una molécula huésped y una molécula de CD. Sin embargo, la estequiometría del complejo puede diferir de una relación 1:1, existiendo asociaciones 2:1, 1:2, 2:2 o incluso más complejas con equilibrios de orden superior que pueden ocurrir simultáneamente [80,96]. Por lo tanto, en el caso de compuestos de bajo peso molecular (como algunos compuestos fenólicos), más de un huésped puede entrar en la cavidad de una CD, mientras que para los compuestos de alto peso molecular, más de una molécula de CD podría unirse al huésped [80]. Por otro lado, se pueden utilizar solventes que facilitan la formación de complejos de inclusión y permiten que las moléculas huésped se disuelvan parcialmente antes de ingresar a la cavidad de la CD [83]. El etanol es un solvente aplicado con frecuencia para estos fines e incluso la estabilidad acuosa de los complejos de inclusión formados puede ser mejorada mediante el empleo de sales inorgánicas [90]. Los efectos más importantes de la interacción entre un huésped poco soluble, como algunos compuestos fenólicos, y las CDs en una solución acuosa son [90,96]:

- La concentración del huésped en la fase disuelta se incrementa significativamente.
- Se modifican las propiedades espectrales del huésped.
- Se modifica la reactividad del huésped, la que en la mayoría de los casos disminuye.
- El huésped se vuelve más hidrófilo tras la formación del complejo.

Por lo tanto, la encapsulación de los compuestos huésped en CDs producen alteraciones fisicoquímicas en ambos agentes, lo que permite evaluar el complejo de inclusión formado mediante diferentes métodos analíticos. Las técnicas más utilizadas para la caracterización de las micropartículas y sus complejos de inclusión son: microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR), dispersión dinámica de luz (DLS), resonancia magnética nuclear de protones (^1H RMN), termogravimetría (TGA), difracción de rayos X (XRD), calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectro de absorbancia (UV-Vis), entre otras [76,78,97].

1.4.4 Encapsulación de compuestos fenólicos mediante ciclodextrinas.

La encapsulación de los compuestos fenólicos tiene el potencial de resolver varios problemas en el uso de estos compuestos, debido a su limitada biodisponibilidad, baja solubilidad en agua y baja estabilidad en condiciones ambientales. En general los compuestos fenólicos pueden degradarse si se exponen al oxígeno, luz, actividades enzimáticas, condiciones adversas de temperatura y pH, iones metálicos, lo que provoca una alteración y disminución de sus propiedades funcionales [98]. Una solución viable para solucionar estos problemas es la encapsulación mediante CDs, que proporcionan una matriz protectora que preserva las funcionalidades bioquímicas de estos compuestos [76]. Algunas de las ventajas de la encapsulación de compuestos fenólicos en CDs son las siguientes:

- ✓ Permiten mejorar la biodisponibilidad e incrementar sus efectos terapéuticos. Basado en una reciente revisión sistemática, dos Santos Lima [99], concluyen que luego de la formación de un complejo de inclusión los flavonoides aumentan sus parámetros farmacocinéticos en relación a los flavonoides libres.
- ✓ Mejorar la solubilidad. La mayoría de los estudios utilizan las propiedades de las CDs para optimizar la solubilidad y estabilidad acuosa de los compuestos fenólicos [78,79,99].
- ✓ Estabilidad y protección a la degradación. La encapsulación mediante CDs protege a algunos compuestos fenólicos de la degradación térmica, la degradación UV y les otorga protección contra la foto-degradación [78]. Esta capacidad es de vital importancia para proteger compuestos inestables a la luz como el resveratrol.

- ✓ Mejora o al menos preserva la capacidad antioxidante. Algunos autores mencionan que la encapsulación de resveratrol en HP- β -CD aumenta su capacidad antioxidante o al menos la preserva y proponen el método ORAC-FL como el más adecuado para cuantificar la actividad antioxidantes de los complejos de inclusión [100,101].

Una gran cantidad y diversidad de compuestos fenólicos “individuales” se ha encapsulado mediante el uso de diferentes CDs, en particular la β -CD y la HP- β -CD son las más utilizadas [78,102–106]. Entre los ácidos fenólicos encapsulados con estas CDs destacan el: ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido ferúlico, vainillina, ácido protocatechico, *p*-hidroxibenzaldehído y el ácido gálico [78,102–104]. Por su parte, entre los flavonoides encapsulados se pueden mencionar: catequina, galato de epigallocatequina, isoquercetina, quercetina, apigenina, rutina, kaempferol, miricetina, astilbina, naringenina, hesperetina, hesperidina [78]. El estilbeno más estudiado para su encapsulación es el resveratrol, aunque también se han realizado trabajos de encapsulación con otros estilbenos como el oxiresveratrol, pterostilbeno, pinosilvin y piceatannol [105,106]. Por otra parte, la encapsulación de “extractos fenólicos” ha recibido menos atención, debido a la dificultad de estudiar los mecanismos de inclusión para mezclas complejas de compuestos. En particular los extractos fenólicos derivados de la industria vitivinícola como el orujo, semillas, pieles y lías de uva se han encapsulado preferentemente mediante secado por aspersión y utilizando maltodextrina como agente encapsulante [107]. Por otro lado, hasta antes de la presente tesis doctoral no se encontraron estudios relacionados con la encapsulación de extractos de sarmientos de vid, aunque un trabajo anterior utilizó la β -CD como agente de extracción de compuestos fenólicos desde sarmientos. Rajha et al [108], realizaron y optimizaron la extracción de compuestos fenólicos desde sarmientos mediante una extracción asistida por β -CD en medio acuoso. La extracción con β -CD permitió la recuperación de resveratrol, ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido ferúlico y ácido *trans*-cinámico, demostrando la capacidad de la β -CD para optimizar los rendimientos de compuestos fenólicos desde sarmientos de vid. Aunque la encapsulación de los compuestos durante la extracción con β -CD es mencionada por el estudio anterior, la formación de los complejos de inclusión, la eficiencia de encapsulación y el perfil fenólico completo de los compuestos presentes en el extracto no fue analizado, por lo que fue estudiado durante la presente tesis doctoral (Ver capítulo 3.3).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

*“Los procesos de producción y encapsulación a escala piloto industrial modifican el perfil fenólico del extracto de sarmientos (*V. vinífera* L.), modificaciones que pueden ser estudiadas mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS)”*

2.2 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios en el perfil fenólico de un extracto de sarmientos (*V. vinífera* L.) durante su producción y encapsulación, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS).

2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar compuestos fenólicos en extractos de sarmientos (*V. vinífera* L.) producido a escala analítica, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS).
2. Analizar el efecto del procesamiento a escala de planta piloto sobre el perfil fenólico del extracto de sarmientos (*V. vinífera* L.), mediante LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS.
3. Encapsular compuestos fenólicos presentes en un extracto de sarmientos (*V. vinífera* L.) producidos a escala de planta piloto mediante secado por pulverización utilizando Hidroxipropil Beta Ciclodextrina (HP- β -CD) y maltodextrina para la formación de complejos de inclusión.

RESULTADOS



3 RESULTADOS

En esta sección se exponen los trabajos que componen la presente tesis doctoral. Los resultados son desarrollados a lo largo de tres publicaciones en las que se incluye sus respectivas metodologías, resultados, discusiones y conclusiones. El primer artículo fue publicado en la revista *Molecules* correspondiente al segundo cuartil (Q2) de las categorías Química, multidisciplinaria/ Bioquímica y Biología molecular. El segundo artículo fue publicado en la revista *Food Research International* que pertenece al primer cuartil (Q1) y primer decil (D1) de la categoría Ciencia y Tecnología Alimentaria. Finalmente, el tercer artículo fue publicado en la revista *Antioxidants* que también pertenece al Q1 y D1 en la misma categoría.

Previo a cada artículo se encuentra su respectivo resumen donde se detallan los objetivos y principales resultados y conclusiones de cada estudio.

La sección de resultados se encuentra organizada en 3 capítulos estrechamente relacionados con cada objetivo específico, previamente mencionados.

1. Identificación de compuestos fenólicos en sarmientos de vid mediante LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS.
2. Extracción a escala de planta piloto y su efecto sobre el perfil de compuestos fenólicos presentes en sarmientos de vid analizado mediante LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS.
3. Encapsulación de los compuestos fenólicos extraídos a partir de sarmientos de vid a escala de planta piloto en HP- β -CD y maltodextrina mediante secado por aspersión.

**3.1 CAPÍTULO 1: PERFIL FENÓLICO DE LOS SARMIENTOS DE VID:
NUEVOS COMPUESTOS IDENTIFICADOS POR LC-ESI-LTQ-
ORBITRAP-MS.**

Artículo titulado: "*Phenolic Profile of Grape Canes: Novel Compounds Identified by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS*"

Autores: **Danilo Escobar Avello**, Julián Lozano-Castellón, Claudia Mardones; Andy J. Pérez, Vania Sáez, Sebastián Riquelme, Dietrich von Baer, Anna Vallverdú-Queralt.

Revista: *Molecules* 2019, 24, 3763.

DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24203763>

RESUMEN

Los sarmientos de vid (*Vitis vinífera* L.) son un subproducto de la industria vitivinícola con un contenido importante de metabolitos secundarios, principalmente polifenoles con un amplio espectro de demostrados beneficios para la salud. Por lo tanto, los sarmientos de vid tienen un potencial económico considerable como fuente de fitoquímicos de alto valor. En este trabajo, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas cuadrupolo-Orbitrap con trampa lineal híbrida de ionización por electropulverización (LC-ESI-LTQ-Orbitrap) se utilizó para la identificación integral de compuestos polifenólicos en los sarmientos de vid. La identificación de polifenoles se realizó comparando sus tiempos de retención, la medición de su masa precisa y la comparación de los patrones de fragmentación de los compuestos encontrados con los de las sustancias de referencia o con los datos disponibles en la literatura. Se identificaron un total de 75 compuestos, incluidos ácidos fenólicos, flavonoides, flavonoles, flavanonoles, flavanonas y estilbenoides. Los polifenoles más abundantes fueron las proantocianidinas y estilbenoides y sus oligómeros. Además, el análisis de espectrometría de masas de alta resolución reveló la presencia de 17 polifenoles nunca descritos previamente en los sarmientos de vid, lo que proporciona un perfil polifenólico más completo, de este potencialmente valioso subproducto.

Article

Phenolic Profile of Grape Canes: Novel Compounds Identified by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS

Danilo Escobar-Avello ^{1,2} , Julián Lozano-Castellón ^{1,3}, Claudia Mardones ⁴, Andy J. Pérez ⁴, Vania Saéz ⁴, Sebastián Riquelme ^{2,4}, Dietrich von Baer ⁴ and Anna Vallverdú-Queralt ^{1,3,*} 

¹ Department of Nutrition, Food Science and Gastronomy XaRTA, Institute of Nutrition and Food Safety (INSA-UB), Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; daniescobar01@gmail.com (D.E.-A.); julian.lozano@ub.edu (J.L.-C.)

² Unidad de Desarrollo Tecnológico, Universidad de Concepción, 4191996 Coronel, Chile; sebastianriquelmerifo@gmail.com

³ Consorcio CIBER, M.P. Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBn), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain

⁴ Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile; cmardone@udec.cl (C.M.); aperezd@udec.cl (A.J.P.); vaniastepsaez@gmail.com (V.S.); dvonbaer@gmail.com (D.v.B.)

* Correspondence: avallverdu@ub.edu; Tel.: +34-93-403-4843

Academic Editor: Jesus Simal-Gandara

Received: 2 October 2019; Accepted: 17 October 2019; Published: 18 October 2019



Abstract: Grape canes (*Vitis vinifera* L.) are a viticulture industry by-product with an important content of secondary metabolites, mainly polyphenols with a broad spectrum of demonstrated health benefits. Grape canes, therefore, have considerable economic potential as a source of high-value phytochemicals. In this work, liquid chromatography coupled with electrospray ionization hybrid linear trap quadrupole-Orbitrap mass spectrometry (LC-LTQ-Orbitrap) was used for the comprehensive identification of polyphenolic compounds in grape canes. Identification of polyphenols was performed by comparing their retention times, accurate mass measured, and mass fragmentation patterns with those of reference substances or available data in the literature. A total of 75 compounds were identified, including phenolic acids, flavanols, flavonols, flavanonols, flavanones, and stilbenoids. The most abundant polyphenols were proanthocyanidins and stilbenoids and their oligomers. Moreover, the high-resolution mass spectrometry analysis revealed the occurrence of 17 polyphenols never described before in grape canes, thereby providing a more complete polyphenolic profile of this potentially valuable by-product.

Keywords: grape canes; polyphenols; LC-LTQ-Orbitrap; *Vitis vinifera*; by-products

1. Introduction

The bark of woody plants considered a by-product of the forestry agricultural, and wood industry. This can be an abundant source of polyphenolics compounds with high recovery yields [1–3]. Bark polyphenols might be esterified and used for the design of thermoplastic blends [4,5] and the developing of adhesive resins [6]. However, the most extended application of bark polyphenols compounds is its biological effects, such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-tumor, antidiabetic, antimutagen, etc. [1,7]. In particular, grape canes, known also as vine-shoots, are one of the most important by-products in viticulture, alongside grape seeds, pomace, stalks, and skins, all of which could provide low-cost raw material for the production of high-value phytochemicals because of their rich polyphenolic content.

Polyphenolic compounds, the most important class of secondary metabolites in *V. vinifera* L., are synthesized by the phenylpropanoid pathway in response to biotic and abiotic stimuli [8]. The most

abundant polyphenols in grape canes are oligostilbenoids and proanthocyanidins [9,10]. Stilbenoids are members of the non-flavonoid phenolic family and play an important role in the defense mechanism of plants. The concentration of stilbenoids in grape canes strongly depends on their storage/treatment after pruning [11]. Proanthocyanidins are oligomers and polymers formed by flavan-3-ol units with multiple possible linkages and different degrees of polymerization [10].

Stilbenoids, mainly (*E*)-resveratrol, have a wide range of health benefits, with positive effects on cardiovascular and cognitive diseases, cancer, type 2 diabetes, oxidative stress, and inflammation states [12]. Proanthocyanidins exhibit a broad spectrum of pharmacological and therapeutic benefits, including prevention of oxidative stress and degenerative diseases, gastrointestinal distress, neurological disorders, pancreatitis and various stages of neoplastic processes and carcinogenesis [13]. Besides stilbenoids and proanthocyanidins, grape canes contain other polyphenolic compounds with high biological value but in lower concentrations. The unique combination of grape phenolic compounds makes grape, raisins and grape canes, a promising source for the development of novel nutraceutical products [14].

Although various polyphenols have been identified and quantified in grape canes [9–11,15–23], a comprehensive chemical profiling is still needed, particularly of specific identities for proanthocyanidins and some polyphenolic derivatives. For the structural elucidation of unknown compounds in complex samples, the high-resolution/accurate mass system, LTQ-Orbitrap-MS, has proven to be a reliable tool [24–30].

The aim of the present work was to provide an accurate and comprehensive identification of polyphenols in grape canes using liquid chromatography coupled with electrospray ionization hybrid linear trap quadrupole-Orbitrap mass spectrometry (LC–LTQ-Orbitrap) analysis, with special focus on previously unreported compounds. The novelty of this study is to extend the knowledge about polyphenols identity of grape canes for the development of additives in food, cosmetics, biomaterials, and other biobased products.

2. Results and Discussion

2.1. General

Table 1 shows the 75 polyphenolic compounds identified in grape canes through LC–LTQ-Orbitrap experiments, along with their retention times (min), accurate mass, ion molecular formula (IMF), error (ppm), and the MS² ions used for identification. The main polyphenolic classes identified were: hydroxybenzoic acids (14), hydroxycinnamic acids (2), flavanols (mainly proanthocyanidins) (31), flavonols (3), flavanonols (3), flavanones (3), and stilbenoids (19). To the best of our knowledge, 17 polyphenols were identified for the first time in grape canes, although some of them have been previously identified in other wine by-products, such as grape seeds [31–33], stalks [34], pomace [27,35] and skins [31,33,36]. Figure 1 shows a base peak chromatogram of a grape cane extract.

2.2. Phenolic Acids

Phenolic acids, abundant in agro-industrial by-products [37], are of interest for their biological activity as anti-inflammatory, hepatoprotective, antioxidant, antimicrobial, cardioprotective, antidiabetic, anticancer, and neuroprotective agents [38]. Phenolic acids identified in grape cane extract can be subdivided into hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids and their derivatives.

Table 1. Phenolic compounds identified in a grape cane extract by liquid chromatography coupled with electrospray ionization hybrid linear trap quadrupole-Orbitrap mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS) in negative mode.

Peak	Compounds	R.T. (min)	Accurate Mass [M – H] [–]	MS/MS Ions (% Intensity)	Δm (ppm)	Ion Molecular Formula (IMF)
Hydroxybenzoic Acids and Derivatives						
1	Monogalloyl-glucose (1)	3.60	331.0668	271.0446(60), 211.0237(20), 169.0133(100)	–0.936	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀
2	Gallic acid *	4.30	169.0141	125.0239(100)	–0.985	C ₇ H ₅ O ₅
3	Monogalloyl-glucose (2)	5.38	331.0664	271.0446(60), 211.0237(20), 169.0133(100)	–1.510	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀
4	Protocatechuic acid- <i>O</i> -hexoside (1)	7.39	315.0719	153.0185(100)	–1.001	C ₁₃ H ₁₅ O ₉
5	Protocatechuic acid	7.66	153.0192	109.0290(100)	–1.058	C ₇ H ₅ O ₄
6	Protocatechuic acid- <i>O</i> -hexoside (2)	8.52	315.0718	153.0186(100)	–0.969	C ₁₃ H ₁₅ O ₉
7	Syringic acid hexoside	8.75	359.0981	197.0446(100)	–0.724	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀
8	2-Hydroxybenzoic acid	9.47	137.0243	93.0341(100)	–1.075	C ₇ H ₅ O ₃
9	Hydroxybenzoyl hexoside	9.96	299.0770	137.0236(100)	–1.039	C ₁₃ H ₁₅ O ₈
10	4-Hydroxybenzoic acid *	10.02	137.0242	93.0340(100)	–1.221	C ₇ H ₅ O ₃
11	Ellagic acid hexoside	13.99	463.0518	300.9974(100)	0.079	C ₂₀ H ₁₅ O ₁₃
12	Gallic acid ethyl ester	14.28	197.0454	169.0135(100)	–1.252	C ₉ H ₉ O ₅
13	Ellagic acid pentoside	16.03	433.0416	300.9975(100), 299.9898(40)	–0.766	C ₁₉ H ₁₃ O ₁₂
14	Ellagic acid *	16.94	300.9980	257.0079(100), 229.0132(60), 185.0235(30)	–1.131	C ₁₄ H ₅ O ₈
Hydroxycinnamic Acids Derivatives						
15	Caftaric acid	9.27	311.0406	179.0343(45), 149.0965(100)	–0.852	C ₁₃ H ₁₁ O ₉
16	Coutaric acid	11.18	295.0456	163.0392(100)	–1.052	C ₁₃ H ₁₁ O ₈
Flavanols (Proanthocyanidins)						
17	(Epi)gallo catechin (EGC) → (epi)gallo catechin (1)	5.69	609.1244	483.0917(20), 441.0812(85), 423.0707(100), 305.0656(45)	–0.966	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄
18	(Epi)gallo catechin → (epi)gallo catechin (2)	7.81	609.1240	483.0913(25), 441.0808(100), 423.0703(90), 305.0653(40)	–1.574	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄
19	Procyanidin trimer (1)	7.90	865.1982	739.1638(15), 713.1479(20), 695.1379(100), 577.1329(25), 451.1016(15), 425.0867(15), 407.0761(20), 289.0709(10)	–1.118	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈
20	(Epi)gallo catechin → (epi)catechin (1)	8.01	593.1305	467.0970(30), 425.0868(100), 407.0763(80), 303.0501(10), 289.0710(70)	0.718	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃
21	(Epi)gallo catechin (1)	8.30	305.0665	261.0761(45), 221.0448(75), 219.0658(65), 179.0344(100)	0.303	C ₁₅ H ₁₃ O ₇
22	(Epi)catechin → (epi)gallo catechin	8.71	593.1301	467.0973(55), 441.0817(40), 423.0715(100), 305.0660(60), 287.0554(10)	0.010	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃
23	(Epi)gallo catechin → (epi)catechin → (epi)gallo catechin	9.09	897.1869	771.1526(25), 729.1426(15), 711.1321(100), 593.1277(30), 305.0651(5)	–1.445	C ₄₅ H ₃₇ O ₂₀
24	(Epi)gallo catechin → (epi)catechin (2)	9.73	593.1296	467.0970(25), 425.0868(100), 407.0761(50), 303.0510(5), 289.0709(40)	–0.715	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃
25	(Epi)gallo catechin → (epi)gallo catechin → (epi)catechin	9.86	897.1868	771.1538(15), 729.1435(25), 711.1331(100), 593.1280(20), 303.0499(10), 289.0706(10)	–1.779	C ₄₅ H ₃₇ O ₂₀
26	Procyanidin dimer (1)	10.44	577.1342	451.1026 (95), 425.0872 (80), 407.0766 (95), 289.0711(100)	–1.610	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂
27	(Epi)gallo catechin (2)	10.73	305.0662	261.0762(40), 221.0449(75), 219.0659(60), 179.0345(100)	1.122	C ₁₅ H ₁₃ O ₇
28	Procyanidin dimer (2)	10.89	577.1347	451.1027(75), 425.0873(100), 407.0768(90), 289.0713(70)	–0.657	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂
29	Catechin *	11.39	289.0715	245.0810(100), 205.0498(40), 179.1342(20)	–0.800	C ₁₅ H ₁₃ O ₆
30	Procyanidin trimer (2)	11.95	865.1978	739.1652(40), 713.1495 (30), 695.1393(100), 577.1340(50), 451.1024(30), 425.0870(25), 407.0764(55), 289.0710 (20)	–0.841	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈

Table 1. Cont.

Peak	Compounds	R.T. (min)	Accurate Mass [M – H] [–]	MS/MS Ions (% Intensity)	Δm (ppm)	Ion Molecular Formula (IME)
Flavanols (Proanthocyanidins)						
31	Procyanidin tetramer	12.13	576.1271 [M – 2H] ^{2–}	1027.2257(35), 865.1948(30), 863.1793(65), 739.1640(30), 451.1016(45), 407.0756(25), 289.0705(100), 287.0548(40)	–0.424	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄
32	Procyanidin dimer (3)	12.28	577.1348	451.1020(50), 425.0867(100), 407.0761(90), 289.0708(45)	–0.883	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂
33	Procyanidin dimer (4)	12.57	577.1356	451.1026(65), 425.0872(100), 407.0766(95), 289.0711(60)	–0.815	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂
34	(Epi)gallocatechin→(epi)catechin (3)	12.77	593.1290	467.0968(30), 425.0865(100), 407.0758(70), 303.0500(10), 289.0707(40)	–1.713	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃
35	(Epi)catechin→(epi)gallocatechin gallate (EGCG)	12.81	745.1400	593.1257(80), 575.1136(55), 457.0757(25), 441.0809(5), 423.0703(100), 305.0655(15)	–2.003	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₇
36	Procyanidin pentamer (1)	13.04	720.1580 [M – 2H] ^{2–}	1315.2897(25), 1153.2595 (25), 1151.2442(55), 1027.2273(25), 865.1955(60), 863.1794(100), 739.1645(25), 635.6298(80), 577.1333(90), 575.1178(80), 451.5990(30), 407.0758(45), 289.0707(70), 287.0550 (40)	0.504	C ₇₅ H ₆₂ O ₃₀
37	Epicatechin *	13.36	289.0715	245.0810(100), 205.0498(40), 179.1342(10)	–0.766	C ₁₅ H ₁₃ O ₆
38	(Epi)gallocatechin gallate (EGCG)	13.74	457.0770	331.0445(70), 305.0653(35), 169.0135(100)	–1.454	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₁
39	(Epi)catechin gallate (ECG)→(epi)catechin (1)	13.86	729.1459	603.1140(5), 577.1345(100), 439.066(5), 425.0876(25), 407.0769(50), 289.0713(10)	–0.230	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₆
40	Procyanidin dimer (5)	14.01	577.1346	451.1025(55), 425.0872(90), 407.0766(100), 289.0711(50)	–0.883	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂
41	Procyanidin trimer (3)	14.39	865.1979	739.1643(40), 713.1486(35), 695.1385(100), 577.1334(55), 451.1020(30), 425.0866(25), 407.0760(50), 289.0708(15)	–0.760	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈
42	(Epi)catechin→(epi)catechin gallate	14.84	729.1449	603.1133(30), 577.1312(35), 559.0917(30), 451.1024(45), 441.0818(30), 407.0764(100), 289.0710(30)	–1.629	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₆
43	Procyanidin trimer (4)	15.43	865.1959	739.1643(50), 713.1489(20), 695.1384(100), 577.1334(50), 451.1020(25), 425.0866(25), 407.0759(55), 289.0707(10)	–3.094	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈
44	Procyanidin pentamer (2)	15.59	720.1578 [M – 2H] ^{2–}	1315.2906(25), 1153.2585(20), 1151.2437(45), 1027.2261(20), 865.1949(50), 863.1793(75), 739.1639(20), 635.6275(100), 577.1330(60), 575.1175(60), 451.1016(20), 407.0756(25), 289.0706(45), 287.0548(25)	–0.079	C ₇₅ H ₆₂ O ₃₀
45	Epicatechin gallate *	16.89	441.0825	289.0710(100), 169.0137(30)	–0.476	C ₂₇ H ₁₇ O ₁₀
46	(Epi)catechin gallate→(epi)catechin (2)	17.54	729.1441	603.1125(5), 577.1332(100), 439.0657(5), 425.0866(25), 407.0760(30), 289.0705(5)	2.184	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₆
47	Theaflavin	20.88	563.1191	545.1064(100), 519.1272(45), 425.0857(40), 407.0751(65), 397.0908(30), 379.0805(60)	–1.295	C ₂₉ H ₂₃ O ₁₂
Flavonols						
48	Myricetin-O-hexoside	15.49	479.0821	317.0288(60), 316.0211(100)	–1.239	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃
49	Quercetin-O-glucoside *	17.23	463.0876	301.0337(100), 299.0174(30)	–1.402	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂
50	Quercetin-3-O-glucuronide	17.28	477.0674	301.0341(100)	–0.700	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃

Table 1. Cont.

Peak	Compounds	R.T. (min)	Accurate Mass [M – H] [–]	MS/MS Ions (% Intensity)	Δm (ppm)	Ion Molecular Formula (IMF)
Flavanonol						
51	Taxifolin	17.01	303.0505	285.0391(100), 177.0185(10), 125.0239(10)	–1.636	C ₁₅ H ₁₁ O ₇
52	Astilbin (1)	17.39	449.1090	303.0497(100), 285.0391(90), 151.0030(30)	–0.211	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁
53	Astilbin (2)	18.22	449.1086	303.0497(100), 285.0391(85), 151.0030(25)	–0.612	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁
Flavanones						
54	Eriodictyol-O-hexoside (1)	13.58	449.1090	287.0545(100)	–0.367	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁
55	Eriodictyol-O-hexoside (2)	19.03	449.1087	287.0548(100)	–0.433	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁
56	Eriodictyol	21.08	287.0556	151.0033(100), 135.0448(10)	–1.677	C ₁₅ H ₁₁ O ₆
Stilbenoids						
57	Resveratrol C-hexoside	13.66	389.1241	269.0812(100), 241.0864(10), 299.0915(5)	–0.208	C ₃₀ H ₂₁ O ₈
58	Resrisol (A or B)	15.15	471.1441	377.1015(90), 349.1067(100), 255.0651(80)	–1.754	C ₂₈ H ₂₃ O ₇
59	Oxidized stilbenoid dimer (1)	16.25	471.1438	349.1066(100)	–2.391	C ₂₈ H ₂₃ O ₇
60	Oxidized stilbenoid dimer (2)	16.85	471.1443	349.1066(100)	–1.351	C ₂₈ H ₂₃ O ₇
61	Stilbenoid dimer (1)(heterodimer)	17.78	469.1283	451.1181(100), 375.0866(30), 363.0869(35)	–1.484	C ₂₈ H ₂₁ O ₇
62	(E)-Piceatannol *	18.01	243.0659	225.0551(100), 201.0551(65), 159.0447(20)	–1.202	C ₁₄ H ₁₁ O ₄
63	Oxidized stilbenoid dimer (3)	18.93	471.1446	349.1067(100)	–2.709	C ₂₈ H ₂₃ O ₇
64	Stilbenoid dimer (2)(heterodimer)	19.23	469.1287	375.0855(20), 363.0857(100)	–1.122	C ₂₈ H ₂₁ O ₇
65	Viniferin diglycoside	19.33	777.2387	615.1848(95), 453.1327(100)	–1.670	C ₄₀ H ₄₁ O ₁₆
66	Pallidol	19.51	453.1340	359.0915(100), 265.0497(10)	–0.820	C ₂₈ H ₂₁ O ₅
67	(E)-resveratrol *	20.27	227.0707	185.0602(65), 143.0496(20)	–2.543	C ₁₄ H ₁₁ O ₃
68	Stilbene dimer (resveratrol + resveratrol)	20.62	453.1339	359.0912(100)	–1.593	C ₂₈ H ₂₁ O ₆
69	Resveratrol dimer-O-hexoside	20.85	615.1866	453.1325(100)	–0.951	C ₃₄ H ₃₁ O ₁₁
70	Stilbenoid tetramer (Hopeaphenol *)	21.17	905.2582	811.2159(100), 717.1748(80)	–2.331	C ₅₆ H ₄₁ O ₁₂
71	Stilbenoid dimer (3)(Scirpusin A)	21.35	469.1283	451.1182(25), 385.1066(50), 375.0860(100), 359.0912(30), 347.0919(15)	–2.188	C ₂₈ H ₂₁ O ₇
72	Stilbenoid tetramer (Isohopeaphenol *)	21.41	905.2580	811.2158(100), 717.1747(80)	–2.596	C ₅₆ H ₄₁ O ₁₂
73	(E)- ϵ -viniferin *	21.68	453.1335	359.0924(100), 347.0919(40)	–1.813	C ₂₈ H ₂₁ O ₆
74	(E)- ω -viniferin	21.87	453.1335	435.1230(35), 411.1229(25), 359.0918(100), 347.0918(55)	–1.593	C ₂₈ H ₂₁ O ₆
75	Stilbenoid tetramer	22.05	905.2576	887.2472(25), 811.2159(50), 799.2164(100), 359.0917(30)	–3.004	C ₅₆ H ₄₁ O ₁₂

* Compounds identified by comparison with pure standards; R.T., retention times; Δm , mass measurement error; compounds **31**, **36**, and **44** appeared as doubly-charged ions; isomers are displayed in the bracket.

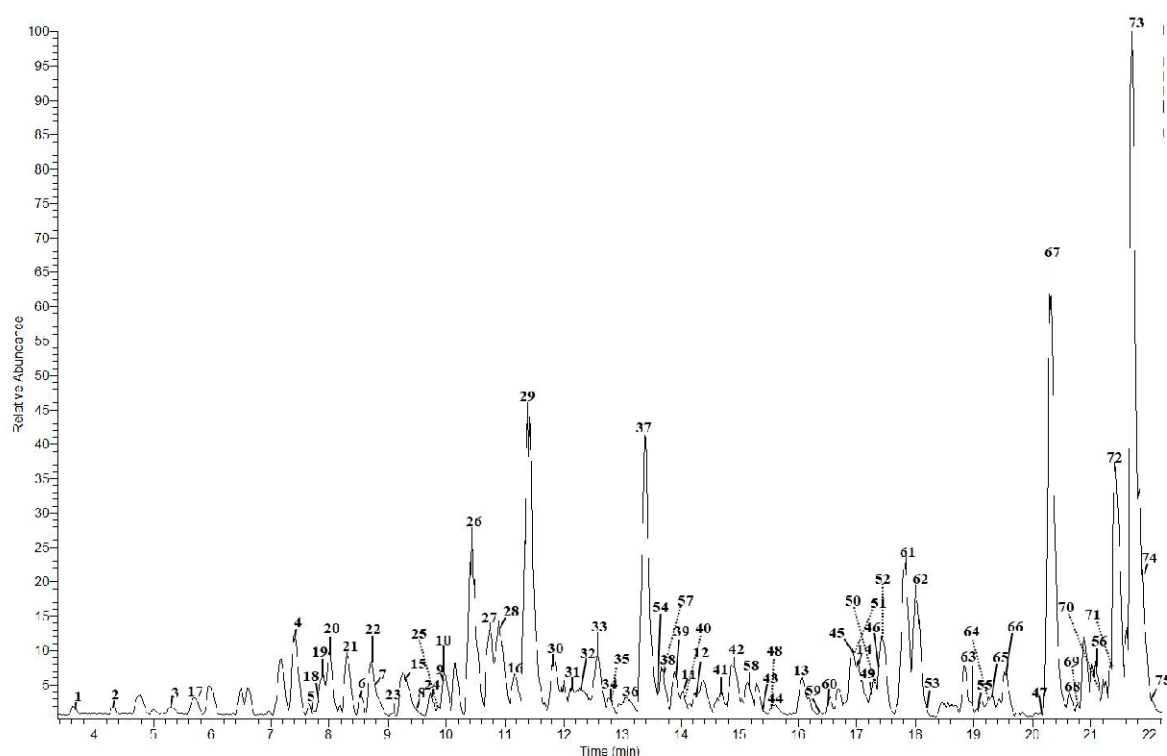


Figure 1. Base peak chromatogram of grape cane. Peaks and compounds are shown in Table 1.

2.2.1. Hydroxybenzoic Acids and Derivatives

A total of fourteen hydroxybenzoic acids were identified in the grape cane extract (Table 1). The typical neutral loss of CO_2 (-44 Da) was observed for: gallic acid (m/z 169.0141, peak 2), protocatechuic acid (m/z 153.0192, peak 5), 2-hydroxybenzoic acid (m/z 137.0243, peak 8), 4-hydroxybenzoic acid (m/z 137.0242, peak 10), and ellagic acid (m/z 300.9980, peak 14). Moreover, gallic, 4-hydroxybenzoic and ellagic acids were confirmed by comparing the retention time and MS^2 spectra with available standards. The presence of these compounds, with the exception of 2-hydroxybenzoic acid (m/z 137.0243, peak 8), was also recently reported in Portuguese vine shoot wastes [39].

Seven hexoside derivatives of hydroxybenzoic acids were detected in the grape cane extract: monogalloyl-glucose (m/z 331.0668, peak 1; m/z 331.0664, peak 3), protocatechuic acid-*O*-hexoside (m/z 315.0719, peak 4; m/z 315.0718, peak 6), syringic acid hexoside (m/z 359.0981, peak 7), hydroxybenzoyl hexoside (m/z 299.0770, peak 9), and ellagic acid hexoside (m/z 463.0518, peak 11). The MS^2 spectra showed the characteristic fragmentation involving cleavage of the hexosyl moiety (-162 Da) [25]. Additionally, both monogalloyl-glucoses showed product ions at m/z 271 and 211, probably generated by the fragmentation of the hexose moiety (-60 Da) [26] and removal of two formaldehyde (CH_2O) groups in the glucose moiety, respectively [40]. Previous studies have identified and quantified phenolic acids (e.g., gallic, protocatechuic, syringic and ellagic acids) in vine shoot extracts [39], but to the best of our knowledge, this is the first report of hydroxybenzoic acid hexoside derivatives in grape canes.

Interestingly, two hydroxybenzoic acid derivatives were also identified. Gallic acid ethyl ester (m/z 197.0454, peak 12) showed an ion at m/z 169 arising from the loss of an ethyl unit (-28 Da). Gallic acid ethyl ester or ethyl gallate have been previously identified in wine extracts [41], but not in grape canes. Ellagic acid pentoside (m/z 433.0416, peak 13) was also identified and confirmed by MS^2 experiments. In the MS^2 spectrum of m/z 433, the ion at m/z 301 was due to the loss of a pentosyl unit (-132 Da) [42]. As far as we know, this is the first time that ellagic acid pentoside has been identified in grape canes.

2.2.2. Hydroxycinnamic Acids Derivatives

Hydroxycinnamic acids are important polyphenol precursors biosynthesized in plants from the amino acids phenylalanine and tyrosine in the shikimate pathway [43]. Hydroxycinnamic acids and their derivatives exhibit antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and ultraviolet protective effects, suggesting a potential application in anti-aging and anti-inflammatory products [44].

Two hydroxycinnamic acids were identified: (i) caftaric acid (m/z 311.0406, peak 15), with ions at m/z 179 (caffeic acid) and 149 (tartaric acid) due to the loss of a tartaric acid moiety (-132 Da) and the presence of a tartaric acid molecule, respectively [45]; and (ii) coutaric acid (m/z 295.0456, peak 16), with an ion at m/z 163 attributed to a coumaric acid molecule observed after the loss of tartaric acid (-132 Da) [31,45]. Caftaric and coutaric acids have been previously identified and quantified in wine and vine shoot extracts [22,23].

2.3. Flavanols (Proanthocyanidins)

Proanthocyanidins identified in grape cane extracts can be subdivided into procyanidins with a 3',4'-dihydroxy substitution and prodelphinidins with a 3',4',5'-trihydroxy substitution, both on the B ring (Figure 2).

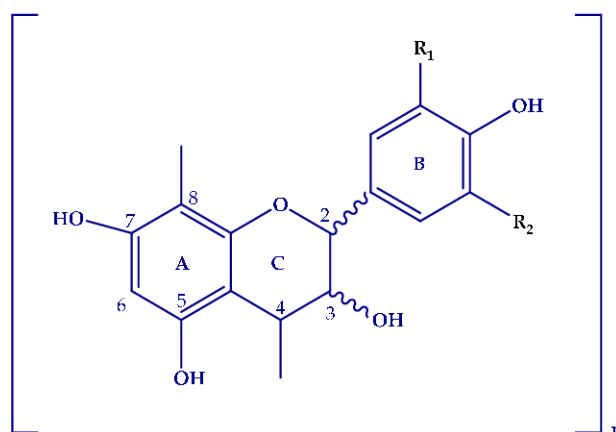


Figure 2. Flavanoid skeleton. Procyanidins: $R_1=H$, $R_2=OH$; Prodelphinidins $R_1=OH$, $R_2=OH$. Adapted from [46].

2.3.1. Procyanidins and Monomers

The flavan-3-ols (+) catechin (m/z 289.0715, peak 29) and (−) epicatechin (m/z 289.0715, peak 37) were confirmed after comparison with standards. In the MS^2 spectrum of m/z 289, ions at m/z 245 $[M - H - 44]^-$ could be attributed to the loss of $-CH_2-CHOH-$ or CO_2 moieties [47,48] and at m/z 205 and 179 to the loss of the flavonoid A ring $[M - H - 84]^-$ and B ring $[M - H - 110]^-$ [48], respectively. (+) Catechin and (−) epicatechin have been widely reported and quantified in grape canes [17,23,39].

Several procyanidins with different degrees of polymerization (DP) were found. Procyanidins show various fragmentation pathways derived from quinone methide (QM), heterolytic ring fission (HRF), and retro-Diels-Alder (RDA) mechanisms [49].

Five procyanidin dimers (DP2) (m/z 577.1342, peak 26; m/z 577.1347, peak 28; m/z 577.1348, peak 32; m/z 577.1356, peak 33; m/z 577.1346, peak 40) were detected. Procyanidins B1, B2, and C1 were confirmed by MS^2 and standard in previous works [9,17]. The MS^2 spectrum of m/z 577 produced ions at m/z 451, 425, 407 and 289. The m/z 451 was attributed to HRF of the C ring with a characteristic loss of 126 Da. The ion at m/z 425 was due to RDA fragmentation with a neutral loss of 152 Da, followed by the loss of a water molecule unit (-18 Da) at m/z 407 $[M - H - 152 - 18]^-$. The ion at m/z 289 was due to QM fission of the interflavan bond producing a distinctive loss of 288 Da [35].

Four procyanidin trimers (DP3) (m/z 865.1982, peak 19; m/z 865.1978, peak 30; m/z 865.1979, peak 41; m/z 865.1959, peak 43) were tentatively identified. In previous studies, two procyanidin trimers, including procyanidin C1, were identified using a QTrap 3200 LC/MS/MS system [17]. The higher sensitivity of the LTQ-Orbitrap system used in the current study allowed the identification of the other two procyanidin trimers. MS² of m/z 865 produced peaks at m/z 739, 713, 695, 577, 451, 425, 407, and 289. The ion at m/z 739 was due to HRF $[M - H - 126]^-$ of the C ring (of the upper unit). The ions at m/z 713 and m/z 695 were produced by the RDA mechanism $[M - H - 152]^-$, followed by the loss of a water molecule $[M - H - 152 - 18]^-$. The ion at m/z 577 was generated by a QM $[M - H - 288]^-$ cleavage between the C and D rings. The remaining ions at m/z 451, 425, 407, and 289 could be explained as for the procyanidin dimers above.

One procyanidin tetramer (DP4) (m/z 576.1271 $[M - 2H]^{2-}$, peak 31) with doubly charged ions was detected, whose fragmentation gave rise to ions at m/z 1027, 865, 863, 739, 451, 407, 289 and 287. The ion at m/z 1027 was produced by HRF $[M - H - 126]^-$ of the tetrameric unit [50]. The ions at m/z 865 and 863 arose from QM $[M - H - 288]^-$ cleavage of the interflavan bond in the top and second units. Another ion at m/z 287 was generated by QM fission due to the ion at m/z 863 $[M - H - 288 - 288]^-$. Tetrameric procyanidins have been previously detected in grape canes [19]. The ions at m/z 739, 451, 407, and 289 are explained above.

Two procyanidin pentamers (m/z 720.1580 $[M - 2H]^{2-}$, peak 36; m/z 720.1578 $[M - 2H]^{2-}$, peak 44) were also detected as doubly charged ions, as confirmed by the mass difference of 0.5 Da between the isotopic peaks (Figure 3). Fragmentation of both doubly charged ions gave ions at m/z 1315, 1153, 1151, 1027, 865, 863, 739, 635, 577, 575, 451, 407, 289, and 287. The ion at m/z 1315 was produced by the HRF $[M - H - 126]^-$ fragmentation pathway from the ion at m/z 1441. The ions at m/z 1153 and 1151 were derived from a QM-type cleavage. The ion at m/z 635 has been previously observed in a procyanidin pentamer in grape stalk extracts [34]. The product ions at m/z 1027, 865, 863, 739, 577, 575, 451, 407, 289, and 287 are explained above for other oligomeric procyanidins. As far as we know, this is the first time that procyanidin pentamers have been identified in grape canes.

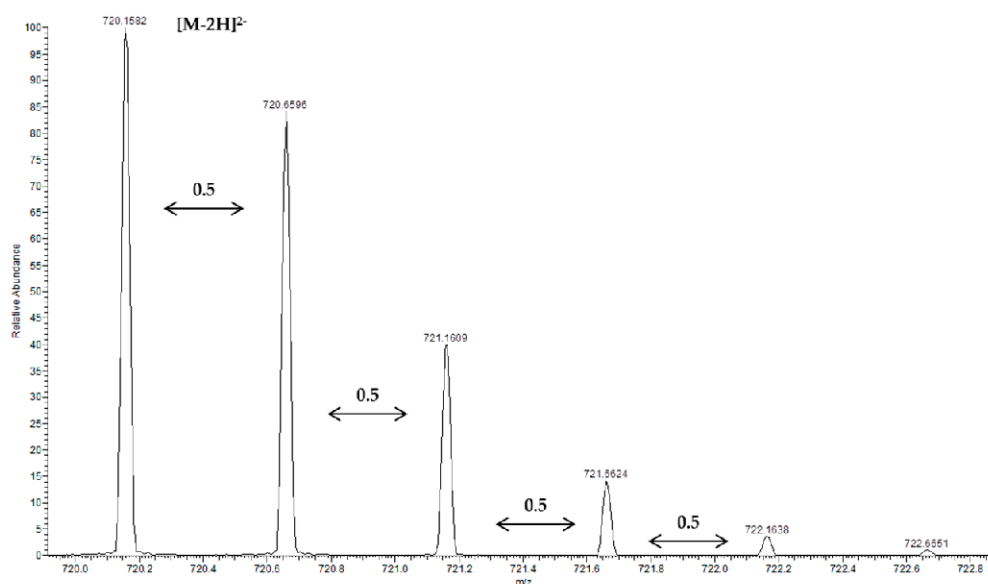


Figure 3. Mass spectra showing the doubly charged ions of the procyanidin pentamer.

2.3.2. Prodelphinidins and Gallate Derivatives

Prodelphinidins have been previously identified in grape canes using a two-dimensional liquid chromatography-based method [10], but the use of a high-resolution mass analyzer, such as the LTQ Orbitrap MS, could be used by improves their characterization.

Epicatechin gallate (m/z 441.0825, peak 45) was confirmed by comparison with the standard. The MS² spectrum of epicatechin gallate produced two fragment ions arising from the cleavage of the ester bond: at m/z 289 for deprotonated epicatechin and at m/z 169 for a deprotonated gallic acid moiety [25]. Epicatechin gallate has been previously identified in vine shoots of the Airén and Cencibel varieties [22].

Three monogallate procyanidin dimers (m/z 729.1459, peak 39; m/z 729.1449, peak 42; m/z 729.1441, peak 46) were also identified. The peaks 39 and 46 were tentatively assigned as (epi)catechin gallate (ECG)→(epi)catechin, and produced ions at m/z 603, 577, 439, 425, 407, and 289. The ion at m/z 603 corresponded to the loss of the A ring (1,3,5-trihydroxybenzene) (−126 Da) of the upper elemental unit via RDA fission [51]. The ions at m/z 577, 425, 407 and 289 showed the same fragmentation pattern as described for procyanidin dimers. The ion at m/z 439 was due to QM fission and was crucial in assigning the gallic acid ester in the upper position [51,52]. In addition, the compound at peak 42 was tentatively identified as (epi)catechin→(epi)catechin gallate, with ions at m/z 603, 577, 451, 441, 407, and 289. The main difference with peaks 39 and 46 was the presence of an ion at m/z 441 due to QM cleavage. This fragment unambiguously confirms that the gallic acid ester is at the bottom position [51]. Procyanidin dimer monogallates (m/z 729) were detected in grape canes in previous studies [10,17], although here their positions are proposed for the first time.

Epigallocatechin and gallocatechin (m/z 305.0665, peak 21; m/z 305.0662, peak 27) were tentatively identified. Fragmentation of both compounds produced ions at m/z 261, 221, 219, and 179. The ion at m/z 261 was due to loss of CO₂ (−44 Da). The ions at m/z 221, 219, and 179 arose from cleavage of the A ring and loss of −126 Da by HRF [53]. To the best of our knowledge, this is the first time that epigallocatechin or gallocatechin have been identified in grape canes.

A prodelphinidin dimer formed with units of (epi)catechin and (epi)gallocatechin (EGC) gallate (m/z 745.1400, peak 35) was tentatively assigned as (epi)catechin→(epi)gallocatechin gallate (EGCG). MS² of m/z 745 produced ions at m/z 593, 575, 457, 441, 423, and 305. The ion at m/z 593 was generated by the loss of a galloyl moiety (−152 Da), and at m/z 575 by the loss of gallic acid (−170 Da). The ion at m/z 457 resulted from QM cleavage and suggested a linkage between (epi)catechin and (epi)gallocatechin gallate [54]. Furthermore, the ion at m/z 305 generated by QM fission suggests that (epi)catechin and (epi)gallocatechin are positioned at the top and bottom, respectively [55]. The ion at m/z 593 underwent further fragmentation, producing an ion at m/z 441 due to RDA (−152 Da) cleavage [55]. The high-intensity ion at m/z 423 arose from the loss of a water molecule (−18 Da) from the ion at m/z 441. As far as we know, this is the first time that (epi)catechin—(epi)gallocatechin gallate has been identified in grape canes.

(Epi)gallocatechin gallate (EGCG) (m/z 457.0770, peak 38) was also tentatively identified. MS² of m/z 457 produced ions at m/z 331, 305, and 169. The ions at m/z 305 and 169 were formed by (epi)gallocatechin and gallic acid deprotonated units, respectively [53]. The ion at m/z 331 was generated by the HRF (−126 Da) mechanism, characteristic of flavan 3-ol monomers [56]. (Epi)gallocatechin gallate is the predominant polyphenol in green tea, and is largely responsible for the biological activity of this beverage [57]. Widely studied for its antioxidant [58], anticarcinogenic [59], and neuroprotective properties [60], (epi)gallocatechin gallate has been identified and quantified in grape seeds, including of the Pinot Noir variety [61], although to our knowledge, this has not been previously reported in grape canes.

Theaflavin (m/z 563.1191, peak 47) was likewise tentatively identified. MS² of m/z 563 produced ions at m/z 545, 519, 425, 407, 397, and 379. The ions at m/z 545 and 519 arose from a loss of H₂O (−18 Da) and CO₂ (−44 Da), respectively [53]. The ion at m/z 425 was due to an RDA rearrangement of the m/z 563 precursor ion with the loss of a neutral molecule (−138 Da). Fragmentation of the ion at m/z 425 led to ions at m/z 407, 397, and 379, corresponding to losses of H₂O (−18 Da), CO (−28 Da), and H₂O and CO (−46 Da), respectively [53]. Theaflavins can be produced from green tea catechins (EC, ECG, EGC, and EGCG) through oxidation by polyphenol oxidase and peroxidase enzymes. This process occurs in fresh green tea leaves during the production of black tea leaves or the green tea fermentation

stage [62]. Accordingly, the presence of theaflavin in grape canes was tentatively attributed to the extraction process, which provoke its formation from other flavan-3-ols. To the best of our knowledge, this is the first report of theaflavin in grape canes.

Four prodelphinidin dimers consisting of (epi)gallocatechin—(epi)catechin (m/z 593.1305, peak 20; m/z 593.1301, peak 22; m/z 593.1296, peak 24; m/z 593.1290, peak 34) were also tentatively identified. Three (epi)gallocatechin→(epi)catechins were observed at peaks 20, 24, and 34. The MS² spectrum of this sequence produced ions at m/z 467, 425, 407, 303, and 289. The ion at m/z 467 was due to fragmentation by HRF $[M - H - 126]^-$ on the upper unit. The ion at m/z 425 arose from RDA cleavage on the extension unit of the dimer [63], and at m/z 407 from water loss at m/z 425. These dimers were identified as (epi)gallocatechin→(epi)catechin based on the specific ions at m/z 303 and 289 derived from QM cleavage [52,63]. Peak 22 of the (epi)catechin→(epi)gallocatechin sequence showed distinctive ions at m/z 441, 423, 305, and 287. The ions at m/z 441 and 423 were generated by the RDA mechanism and the subsequent loss of a water molecule [64]. The ions at m/z 305 and 287 resulted from QM cleavage and were specific to the (epi)catechin→(epi)gallocatechin sequence [52]. Prodelphinidin dimers (m/z 593) have been detected in grape cane extracts in previous studies [10,17], although their sequences are proposed here for the first time.

Two prodelphinidin dimers consisting of (epi)gallocatechin→(epi)gallocatechin (m/z 609.1244, peak 17; m/z 609.1240, peak 18) were tentatively identified. The MS² spectrum of m/z 609 produced ions at m/z 483, 441, 423, and 305. The ion at m/z 483 was due to HRF $[M - H - 126]^-$ on the upper unit. The ion at m/z 441 can be attributed to RDA-type fragmentation and at m/z 423 to water elimination from m/z 441. The ion at m/z 305 was produced by QM cleavage between the C and D rings [64]. Prodelphinidin dimers made up of two (epi)gallocatechin units have been previously identified in red wine [52,64], although not in grape canes.

Two prodelphinidin trimers (m/z 897.1869, peak 23; m/z 897.1868, peak 25) were tentatively identified. A trimer with the sequence (epi)gallocatechin→(epi)catechin→(epi)gallocatechin was detected at peak 23, with ions at m/z 771, 729, 711, 593, and 305. The ion at m/z 771 was generated by HRF $[M - H - 126]^-$ of the C ring. The ion at m/z 729 was produced by an RDA-type mechanism on the upper unit, and the consequent loss of a water molecule led to m/z 711. The ions at m/z 593 and 305 were due to QM cleavage between the C and D rings [64] (Figure 4A), and were specific to the proposed sequence. Peak 25 corresponds to (epi)gallocatechin→(epi)gallocatechin→(epi)catechin, with ions at m/z 771, 729, 711, 593, 303, and 289. Specific ions at m/z 303 and 289 were detected, thereby indicating a QM cleavage of the interflavan bonds and formation of monomeric units, (epi)gallocatechin (-3H) and (epi)catechin, respectively (Figure 4B) [65]. A prodelphinidin trimer (m/z 897) was previously identified in a grape cane extract [10]. The sequences of the two prodelphinidin trimers identified here are proposed for the first time.

2.4. Flavonols and Derivatives

Flavonols are biologically valuable phytochemicals associated with antioxidant and anticancer activities. In particular, myricetin has shown a wide spectrum of biological properties, including antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, and possibly even protection against Parkinson's and Alzheimer's disease [66]. Quercetin, on the other hand, has attracted attention for its potential effects against cardiovascular diseases [67]. Three conjugated flavonols were identified in the chromatograms of grape cane extracts.

Myricetin-O-hexoside (m/z 479.0821, peak 48) showed ions at m/z 317 and 316 corresponding to the loss of a hexoside moiety (−162 Da) with concomitant H rearrangement, as usually occurs with polyphenol O-glycosides [68]. Myricetin-O-hexoside was tentatively identified by comparison with the mass spectra of previous studies using the LTQ-Orbitrap to analyze red wine [25], persimmon leaves [28], and grape pomace [27]. Although myricetin has been previously identified and quantified in vine shoot extracts [39], to our knowledge, this is the first identification of its hexoside derivatives in grape canes.

Quercetin-*O*-glucoside (m/z 463.0876, peak 49) was unambiguously determined and confirmed by comparison with its pure standard. The MS² spectrum of m/z 463 produced ions at m/z 301 and 299 due to the loss of a hexoside moiety (−162 Da) and concomitant H rearrangement, respectively. Quercetin-*O*-hexoside was detected previously in grape canes using a QTrap3200 LC/MS/MS system [17].

Quercetin-3-*O*-glucuronide (m/z 477.0674, peak 50) was also identified. The MS² spectrum of m/z 477 revealed an ion at m/z 301 arising from the loss of a glucuronide moiety (−176 Da). Quercetin-3-*O*-glucuronide has been previously identified in grape canes infected by Bois noir, a serious grapevine yellows disease [19].

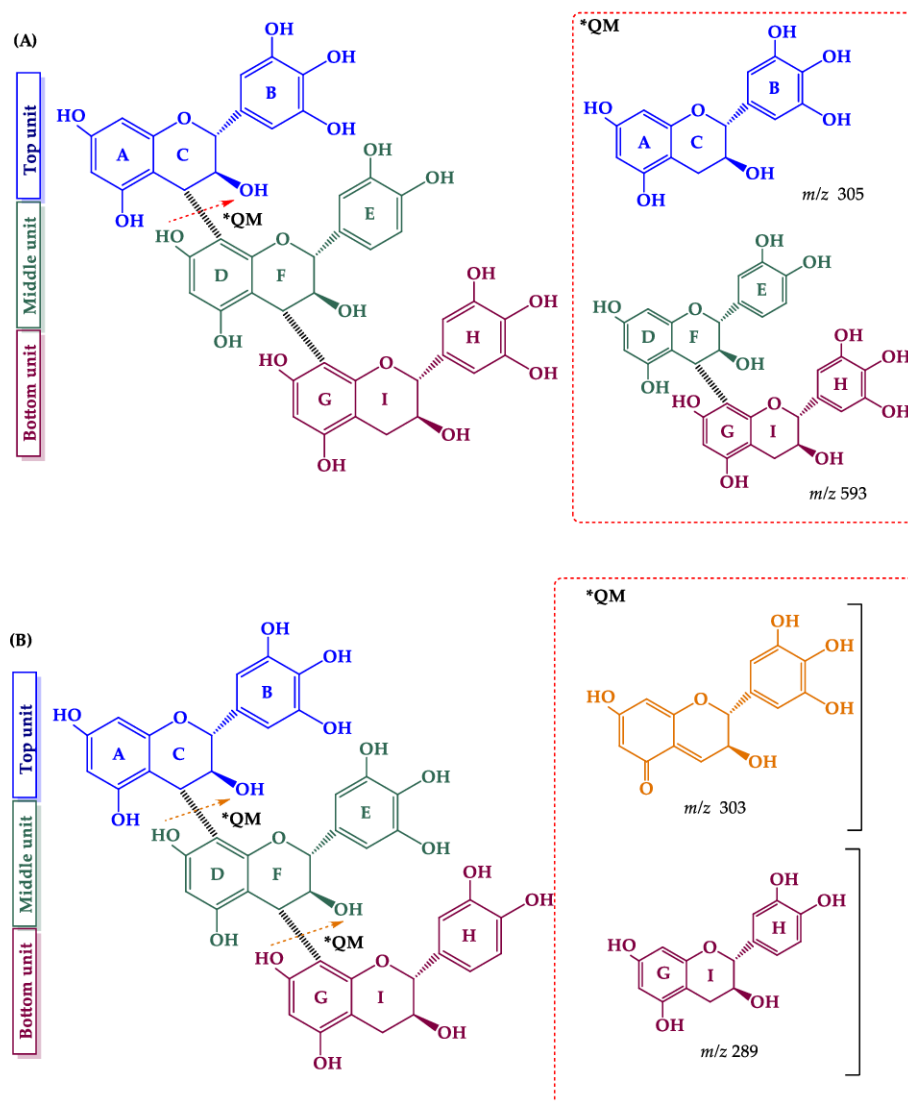


Figure 4. Fragmentation pathways of (epi)gallocatechin→(epi)catechine→(epi)gallocatechin (A) and (epi)gallocatechin→(epi)gallocatechin→(epi)catechine (B): key ions produced by quinone methide (QM) fragmentation.

2.5. Flavanonols and Derivatives

Flavanonols, also known as dihydroflavonols, are a polyphenol subclass inversely associated with diabetes in animal and in vitro models [69]. Furthermore, a high intake of dihydroflavonols has been linked with a reduced risk of diabetes in elderly persons at high risk of cardiovascular disease [70]. Thus, flavanonols, particularly dihydroquercetin (or taxifolin), have high potential value for the development of new natural drugs for the control of type 2 diabetes.

Three flavanonols were identified in the grape cane extract. Taxifolin (m/z 303.0505, peak 51) showed ions at m/z 285, 177, and 125. The ion at m/z 285 was due to the loss of a water molecule (-18 Da), whereas at m/z 177 and 125 the ions correspond to cleavage of the C ring attributed to $^{1,4}B^- - 2H$, and $^{1,4}A^- + 2H$ scissions, respectively (Figure 5) [71]. This is the first report of taxifolin in extracts from grape canes.

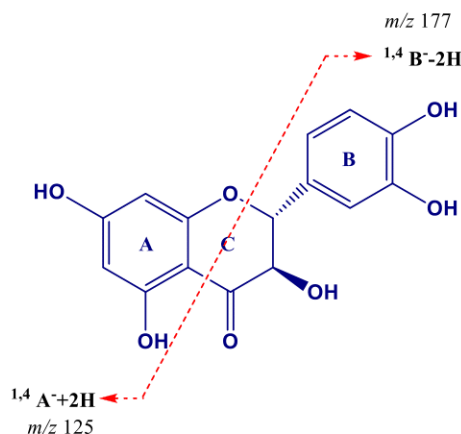


Figure 5. Proposed formation of product ions at m/z 177 and 125 for taxifolin (dihydroquercetin).

Two isomers of astilbin (m/z 449.1090, peak 52; m/z 449.1086, peak 53) were also tentatively identified. The MS^2 spectrum of m/z 449 produced ions at m/z 303, 285, and 151. Those at m/z 303 and 285 were generated by the loss of a rhamnose moiety (-146 Da) and the consecutive loss of a water molecule (-18 Da), respectively. The ion at m/z 151 was generated after RDA-type cleavage [72]. Astilbin (dihydroquercetin-rhamnoside) (m/z 449) has been previously identified in grape canes [19].

2.6. Flavanones and Derivatives

Eriodictyol and its glycoside derivatives are the main flavanones found in grape canes. Eriodictyol protects against oxidative stress and could have potential application in nutraceuticals for the prevention of cardiovascular disease [73]. Eriodictyol and two of its glycoside conjugates were identified in the grape cane extract.

The MS^2 spectrum of eriodictyol-O-hexoside (m/z 449.1090, peak 54; m/z 449.1087, peak 55) produced an ion at m/z 287 generated by the loss of a hexosyl moiety (-162 Da). This is the first time that eriodictyol-O-hexoside is reported from grape canes.

Eriodictyol (m/z 287.0556, peak 56) showed product ions at m/z 151 and 135 formed by an RDA-type fragmentation in the C ring involving type $^{1,3}A^-$ and $^{1,3}B^-$ scission (Figure 6) [74], respectively. Eriodictyol has been previously identified in elicited *V. vinifera* (Pinot Noir) hairy root culture extracts by LC-MS and ^{13}C NMR methods [21].

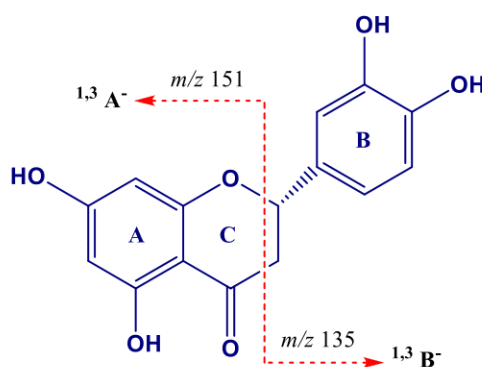


Figure 6. Proposed formation of product ions at m/z 135 and 151 for eriodictyol.

2.7. Stilbenes and Derivatives

Several authors have reported stilbenes as well as oligostilbenoids in grape canes [9,10,17,75]. The most relevant stilbene is resveratrol, associated with activity against cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, and cancer [76]. In grape canes, the most abundant polyphenolic compounds are oligomeric stilbenes (oligostilbenoids) [9].

2.7.1. Stilbene Monomers

Resveratrol (m/z 227.0707, peak 67) was confirmed by comparison with an available standard. The MS² spectrum of m/z 227 showed ions at m/z 185 [M – H – 42][–] and 143 [M – H – 42 – 42][–] produced by the sequential loss of two ketene molecules (C₂H₂O) [77].

Piceatannol (m/z 243.0659, peak 62) was also identified by comparison with its pure standard. The MS² spectrum of m/z 243 produced ions at m/z 225 [M – H – 18][–], arising from the loss of a water molecule, and at m/z 201 [M – H – 42][–] and 159 [M – H – 42 – 42][–] due to successive losses of C₂H₂O. Both monomers have been previously identified in grape cane extract [9,11,17,18].

2.7.2. Stilbene Dimers

Four different resveratrol dimers were identified. (i) Pallidol (m/z 453.1340, peak 66) showed ions at m/z 359 [M – H – 94][–] and 265 [M – H – 94 – 94][–] produced by successive losses of one and two phenol groups, respectively [78]. (ii) (*E*)- ϵ -viniferin (m/z 453.1335, peak 73) was identified by comparison with its pure standard. The MS² spectrum of (*E*)- ϵ -viniferin showed ions at m/z 359 [M – H – 94][–], produced by the loss of a phenol group, and at m/z 347 [M – H – 106][–], by the loss of 4-methylenecyclohexa-2,5-dienone [78]. (iii) (*E*)- ω -viniferin (m/z 453.1335, peak 74) was tentatively identified and showed ions at m/z 435 [M – H – 18][–] and 411 [M – H – 42][–], produced by the loss of a water molecule and a C₂H₂O group, respectively, and at m/z 359 and 347, as explained above. (iv) The stilbenoid dimer (m/z 453.1339, peak 68) was tentatively identified as a resveratrol dimer and showed a high intensity ion at m/z 359 [M – H – 94][–] due to the loss of a phenol group. Several stilbenoid dimers with a very similar structure, parthenocissin A, quadrangularin A, and ampelopsin D, are reported in the literature. Therefore, the accurate identity of this compound should be elucidated by NMR spectroscopy techniques [33,79]. Resveratrol dimers have been previously identified in grape cane extracts [9,17].

Three stilbenoid heterodimers consisting of (*E*)-resveratrol and (*E*)-piceatannol with signals at m/z 469 were also detected. Stilbenoid dimer 1 (m/z 469.1283, peak 61) revealed ions at m/z 451 [M – H – 18][–] and 375 [M – H – 94][–], due to the loss of a water molecule and a phenol moiety, respectively, and at m/z 363 [M – H – 106][–] due to the loss of C₇H₆O. Stilbenoid dimer 2 (m/z 469.1287, peak 64) was also tentatively identified and showed ions at m/z 363 and 375, explained above. Stilbenoid dimer 3 (m/z 469.1283, peak 71) revealed ions at m/z 385 [M – H – 84][–] (the loss of two C₂H₂O moieties) [80], at m/z 359 [M – H – 110][–] (the loss of the pyrocatechol or resorcinol moiety) [9,80], and at m/z 347 [M – H – 122][–] (the loss of C₇H₆O₂). The latter ion was observed by Moss et al. [78] and Sáez et al. [9] for scirpusin A.

Four oxidized dimers with signals at m/z 471 were tentatively identified. Restrisol (A or B) (m/z 471.1441, peak 58) revealed ions at m/z 377 [M – H – 94][–], due to the loss of a phenolic group, at m/z 349 [M – H – 94 – 28][–], produced by the consecutive loss of a phenol group (–94 Da) and carbon monoxide CO (–28 Da), and at m/z 255 [M – H – 94 – 28 – 94][–], due to the successive loss of phenol (–94 Da), CO (–28 Da) and phenol (–94 Da) groups [78]. Another three compounds with the same signals at m/z 471 were assigned as oxidized dimers (1 to 3) (m/z 471.1438, peak 59; m/z 471.1443, peak 60; m/z 471.1446, peak 63), and revealed a prominent ion at m/z 349 analogous to restrisol. On the other hand, restrisol and oxidized stilbenoid dimers could be formed by dimerization of resveratrol induced by the laccase enzymes or its isoform produced by the mycopathogen *Botrytis cinerea* [81]. Oxidized dimers have also been previously identified in grape canes [9,17].

2.7.3. Glycosylated Stilbenes

Resveratrol C-hexoside (m/z 389.1241, peak 57) was tentatively identified. The MS² spectrum of m/z 389 showed ions at m/z 269 and 299 with losses of 120 Da and 90 Da, respectively, which is the typical fragmentation pattern for C-glycosides in MS² mode [82]. Furthermore, another ion at m/z 241 was observed with the same relative abundance as reported by Püssa et al. [83]. Resveratrol C-hexoside designated as *E*-3,5,4'-trihydroxystilbene 2-C-glucoside has been previously identified in grape canes [75].

Resveratrol dimer-O-hexoside (m/z 615.1866, peak 69) was also tentatively identified. MS² of m/z 615 showed a high intensity ion at m/z 453 [M – H – 162][–] produced by the loss of a hexoside moiety. To our knowledge, this is the first resveratrol dimer-O-hexoside identified in grape cane extract.

Viniferin diglycoside (m/z 777.2387, peak 65) was also tentatively identified. The MS² of m/z 777 showed ions at m/z 615 [M – H – 162][–] and 453 [M – H – 162 – 162][–] corresponding to the loss of one hexoside unit and two hexoside units, respectively. Viniferin diglycoside has been previously identified in grape canes [10].

2.7.4. Stilbene Oligomers

Hopeaphenol and isohopeaphenol (m/z 905.2582, peak 70; m/z 905.2580, peak 72) were confirmed after comparison with the previously isolated standards [9]. The two compounds showed the same ions at m/z 811 and 717, and their identification was confirmed based on the elution time order. The ions at m/z 811 [M – H – 94][–] and 717 [M – H – 94 – 94][–] were produced by the loss of one and two phenol moieties, respectively [78].

A stilbenoid tetramer (m/z 905.2576, peak 75), tentatively identified, revealed ions at m/z 887, 811, 799, and 359. The ion at m/z 887 [M – H – 18][–] was produced by the loss of a water molecule and at m/z 811 [M – H – 94][–] by the loss of a phenolic group. The ion at m/z 799 was probably due to the loss of 4-methylenecyclohexan-2,5-dienone (–106 Da), as proposed by Moss et al. [78]. The ion at m/z 359 was due to the loss of a phenolic group from a previously divided tetramer molecule [78]. Stilbenoid tetramers has been previously identified in grape canes [9,10,17].

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

Acetonitrile, formic acid, water, and ethanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All solvents were of HPLC grade. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Gallic, ellagic, and 4-hydroxybenzoic acid, (+)-catechin, (–)-epicatechin, (*E*)-resveratrol, (*E*)-piceatannol, quercetin-*O*-glucoside, and (*E*)- ϵ -viniferin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Epicatechin gallate was acquired from Extrasynthèse (Genay, France). All standards were handled without exposure to light.

3.2. Grape Cane Samples

Grape canes (*Vitis vinifera* L.) of the variety Pinot Noir were collected from healthy plants in an organic vineyard (chemical fertilizers, pesticides, fungicides, not employed), Viña De Neira, located in Ránquil, Itata Valley, the Biobio region in South Chile (36°36'50.33" S, 72°39'40.63" W at 279 m of altitude). After pruning, all samples were cut in 30–50 cm pieces and stored at room temperature (~20 °C) for at least three months [9,10].

3.3. Polyphenol Extraction from Grape Canes

Grape canes were handled in a room with light filters to prevent photodegradation and oxidation of the polyphenols. The extraction was done following a previously reported procedure with minor modifications [82].

Grape canes (0.5 g, $n = 3$) were homogenized and vortexed for 1 min with 4 mL ethanol/water (80:20, v/v) and then sonicated in an ultrasound bath (Bandelin electronic GmbH&Co.KG, Berlin, Germany) for 10 min. The grape cane extract was centrifuged at 4000 RPM for 5 min at 4 °C. The supernatant was collected and the extraction procedure was repeated twice. The supernatants were combined and evaporated under nitrogen flow, and the residue was reconstituted into 0.1% of aqueous formic acid (5 mL). The extract was filtered by 0.20 μ m PTFE (Waters Corporation, Mildford, MA, USA) into an amber vial. Samples were stored at −20 °C until analysis by LC LTQ-Orbitrap.

3.4. LC-LTQ-Orbitrap-MS Analyses

Liquid chromatography analysis was performed using an Accela chromatograph (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with a quaternary pump, a photodiode array detector (PDA), and a thermostated autosampler. Chromatographic separation was performed in an Atlantis T3 column 2.1 $\times$ 100 mm, 3 μ m (Waters, Milford, MA, USA). Gradient elution of analytes was carried out with H₂O/0.1% H-COOH (solvent A) and CH₃CN (solvent B) at a constant flow rate of 0.350 mL/min, and the injection volume was 5 μ L. A non-linear gradient was used: 0 min, 2% B; 0–2 min, 8% B; 2–12 min, 20% B; 12–13 min, 30% B; 13–14 min, 100% B; 14–17 min, 100% B; 17–18 min, 2% B and the column was equilibrated for 5 min to initial conditions [28].

The LC system was coupled to an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) used for accurate mass measurements and equipped with an ESI source operated in negative mode. Operation parameters were as follows: source voltage, 4 kV; sheath gas, 20 a.u. (arbitrary units); auxiliary gas, 10 a.u.; sweep gas, 2 a.u.; and capillary temperature, 275 °C. Default values were used for most other acquisition parameters (FT Automatic gain control (AGC) target 5×10^5 for MS mode and 5×10^4 for MSⁿ mode). Grape cane samples were analyzed in full scan mode at a resolving power of 30,000 (FWHM at m/z 400) and data-dependent MS/MS events acquired at a resolving power of 15,000. The most intense ions detected in the full scan spectrum were selected for the data-dependent scan. Parent ions were fragmented by high-energy C-trap dissociation (HCD) with normalized collision energy of 35 V and an activation time of 10 ms. The mass range in Fourier transformation mass spectrometry (FTMS) mode was from m/z 100 to 1000 [28]. Instrument control and data acquisition were performed with Xcalibur 3.0 software (Thermo Fisher Scientific).

4. Conclusions

The use of LC-LTQ-Orbitrap-MS allowed a comprehensive profiling of polyphenols in a grape cane extract. The characterization was carried out based on accurate mass measurement with low error (<3.1 ppm) and MS² spectrum data. The polyphenolic compounds were confirmed by comparisons with pure standards whenever possible, as well as by referring to the literature. A total of 75 polyphenolic compounds were identified or tentatively characterized, 17 of them reported for the first time in grape canes. Most of the identified polyphenols were hexoside derivatives, such as syringic acid hexoside, hydroxybenzoyl hexoside, ellagic acid hexoside, myricetin-*O*-hexoside, eriodictyol-*O*-hexoside, and resveratrol dimer-*O*-hexoside. Additionally, an exhaustive analysis of proanthocyanidins showed for the first time the presence of pentameric procyanidins and (epi)gallocatechins, and the specific sequence of each prodelphinidin compound.

The reported results broaden knowledge of the polyphenol profile of grape canes and may be useful for further investigations related to the production of high-added-value food additives based on this by-product.

Author Contributions: Conceptualization, D.E.-A., D.v.B., S.R., C.M., and A.V.-Q.; methodology, D.E.-A., J.L.-C., A.V.-Q.; formal analysis, J.L.-C., and D.E.-A.; investigation, D.E.-A., J.L.-C., D.v.B., and A.V.-Q.; resources, A.J.P., and C.M.; writing—original draft preparation, D.E.-A.; writing—review and editing, A.V.-Q., and A.J.P.; visualization, D.E.-A., V.S., and A.V.-Q.; supervision, A.V.-Q.; project administration, A.J.P., C.M.; A.V.-Q. funding acquisition, A.J.P., C.M., A.V.-Q.

Funding: This research was funded by CONICYT PCI REDES170051; CICYT (AGL2016-79113-R) from the Spanish Ministry of Industry, Economy and Competitiveness, the Centro de Investigación Biomédica en Red, (CIBEROBN), Generalitat de Catalunya (2017SGR196), and CONICYT PIA/APOYO CCTE AFB170007. D.E.-A. is grateful to the CONICYT PFCHA/DOCTORADO BECAS CHILE/2017—72180476. A.V.-Q. and J.L.-C. thanks the Ministry of Science, Innovation and Universities for the Ramon y Cajal contract (RYC-2016-19355) and FPI contract [BES-2017-080017], respectively. The authors wish to thank the CCI-UB for the mass spectrometry equipment.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

FTMS	fourier transformation mass spectrometry
PDA	photodiode array detector
AGC	automatic gain control
PTFE	polytetrafluoroethylene
HCD	high-energy C-trap dissociation
FWHM	full width at half maximum
a.u.	arbitrary units
ESI	electrospray ionization
HPLC	high performance liquid chromatography
MS	mass spectrometry
LC	liquid chromatography
¹³ C-NMR	Carbon-13 nuclear magnetic resonance
EC	catechin
ECG	catechin gallate
EGC	galocatechin
EGCG	galocatechin gallate
QTrap	quadrupole ion trap
DP	degree of polymerization
QM	quinone methide
HRF	heterolytic ring fission
RDA	retro-Diels-Alder
IMF	Ion molecular formula
LC-LTQ-Orbitrap	liquid chromatography coupled with electrospray ionization hybrid linear trap quadrupole-Orbitrap mass spectrometry

References

1. Tanase, C.; Mocan, A.; Coşarcă, S.; Gavan, A.; Nicolescu, A.; Gheldiu, A.M.; Vodnar, D.C.; Muntean, D.L.; Crişan, O. Biological and chemical insights of beech (*Fagus sylvatica* L.) bark: A source of bioactive compounds with functional properties. *Antioxidants* **2019**, *8*, 417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. García, D.E.; Fuentealba, C.A.; Salazar, J.P.; Pérez, M.A.; Escobar, D.; Pizzi, A. Mild hydroxypropylation of polyflavonoids obtained under pilot-plant scale. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *87*, 350–362. [[CrossRef](#)]
3. Bocalandro, C.; Sanhueza, V.; Gómez-Caravaca, A.M.; González-Álvarez, J.; Fernández, K.; Roedel, M.; Rodríguez-Estrada, M.T. Comparison of the composition of *Pinus radiata* bark extracts obtained at bench- and pilot-scales. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *38*, 21–26. [[CrossRef](#)]
4. García, D.E.; Delgado, N.; Aranda, F.L.; Toledo, M.A.; Cabrera-Barjas, G.; Sintjago, E.M.; Escobar-Avello, D.; Paczkowski, S. Synthesis of maleilated polyflavonoids and lignin as functional bio-based building-blocks. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *123*, 154–163. [[CrossRef](#)]
5. García, D.E.; Gavino, J.; Escobar, D.; Cancino, R.A. Maleinated polyflavonoids and lignin as functional additives for three kinds of thermoplastics. *Iran. Polym. J.* **2017**, *26*, 295–304. [[CrossRef](#)]

6. Santos, J.; Delgado, N.; Fuentes, J.; Fuentealba, C.; Vega-Lara, J.; García, D.E. Exterior grade plywood adhesives based on pine bark polyphenols and hexamine. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *122*, 340–348. [[CrossRef](#)]
7. Coşarcă, S.L.; Moacă, E.A.; Tanase, C.; Muntean, D.L.; Pavel, I.Z.; Dehelean, C.A. Spruce and beech bark aqueous extracts: Source of polyphenols, tannins and antioxidants correlated to in vitro antitumor potential on two different cell lines. *Wood Sci. Technol.* **2019**, *53*, 313–333. [[CrossRef](#)]
8. Vogt, T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant* **2010**, *3*, 2–20. [[CrossRef](#)]
9. Sáez, V.; Pastene, E.; Vergara, C.; Mardones, C.; Hermosín-gutiérrez, I.; Gómez-alonso, S.; Gómez, M.V.; Theoduloz, C.; Riquelme, S.; Baer, D. Von Oligostilbenoids in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir grape cane extract: Isolation, characterization, in vitro antioxidant capacity and anti-proliferative effect on cancer cells. *Food Chem.* **2018**, *265*, 101–110. [[CrossRef](#)]
10. Montero, L.; Sáez, V.; von Baer, D.; Cifuentes, A.; Herrero, M. Profiling of *Vitis vinifera* L. canes (poly)phenolic compounds using comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1536*, 205–215. [[CrossRef](#)]
11. Gorena, T.; Saez, V.; Mardones, C.; Vergara, C.; Winterhalter, P.; Von Baer, D. Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chem.* **2014**, *155*, 256–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ramírez-Garza, S.L.; Laveriano-Santos, E.P.; Marhuenda-Muñoz, M.; Storniolo, C.E.; Tresserra-Rimbau, A.; Vallverdú-Queralt, A.; Lamuela-Raventós, R.M. Health effects of resveratrol: Results from human intervention trials. *Nutrients* **2018**, *10*, 1892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bagchi, D.; Swaroop, A.; Preuss, H.G.; Bagchi, M. Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: An overview. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2014**, *768*, 69–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Cosme, F.; Pinto, T.; Vilela, A. Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view. *Beverages* **2018**, *4*, 22. [[CrossRef](#)]
15. Zhang, A.; Wan, L.; Wu, C.; Fang, Y.; Han, G.; Li, H.; Zhang, Z.; Wang, H. Simultaneous determination of 14 phenolic compounds in grape canes by HPLC-DAD-UV Using Wavelength. *Molecules* **2013**, *18*, 14241–14257. [[CrossRef](#)]
16. Farhadi, K.; Esmaeilzadeh, F.; Hatami, M.; Forough, M.; Molaie, R. Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. *Food Chem.* **2016**, *199*, 847–855. [[CrossRef](#)]
17. Sáez, V.; Gayoso, C.; Riquelme, S.; Pérez, J.; Vergara, C.; Mardones, C.; von Baer, D. C18 core-shell column with in-series absorbance and fluorescence detection for simultaneous monitoring of changes in stilbenoid and proanthocyanidin concentrations during grape cane storage. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2018**, *1074*, 70–78. [[CrossRef](#)]
18. Vergara, C.; Von Baer, D.; Mardones, C.; Wilkens, A.; Wernekinck, K.; Damm, A.; MacKe, S.; Gorena, T.; Winterhalter, P. Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 929–933. [[CrossRef](#)]
19. Rusjan, D.; Mikulic-Petkovsek, M. Phenolic responses in 1-year-old canes of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay induced by grapevine yellows (Bois noir). *Aust. J. Grape Wine Res.* **2015**, *21*, 123–134. [[CrossRef](#)]
20. Ewald, P.; Delker, U.; Winterhalter, P. Quantification of stilbenoids in grapevine canes and grape cluster stems with a focus on long-term storage effects on stilbenoid concentration in grapevine canes. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 326–331. [[CrossRef](#)]
21. Tisserant, L.P.; Hubert, J.; Lequart, M.; Borie, N.; Maurin, N.; Pilard, S.; Jeandet, P.; Aziz, A.; Renault, J.H.; Nuzillard, J.M.; et al. ¹³C NMR and LC-MS Profiling of stilbenes from elicited grapevine hairy root cultures. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2846–2855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Cebrián, C.; Sánchez-Gómez, R.; Salinas, M.R.; Alonso, G.L.; Zalacain, A. Effect of post-pruning vine-shoots storage on the evolution of high-value compounds. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *109*, 730–736. [[CrossRef](#)]
23. Vallverdu-Queralt, A.; Verbaere, A.; Meudec, E.; Cheynier, V.; Sommerer, N. Straightforward method to quantify GSH, GSSG, GRP, and hydroxycinnamic acids in wines by UPLC-MRM-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 142–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Vallverdú-Queralt, A.; Regueiro, J.; Rinaldi-Alvarenga, J.F.; Martínez-Huélamo, M.; Leal, L.N.; Lamuela-Raventós, R. Characterization of the phenolic and antioxidant profiles of selected culinary herbs and spices: Caraway, turmeric, dill, marjoram and nutmeg. *Food Sci. Technol.* **2015**, *35*, 189–195. [[CrossRef](#)]

25. Vallverdú-Queralt, A.; Boix, N.; Piqué, E.; Gómez-Catalan, J.; Medina-Remon, A.; Sasot, G.; Mercader-Martí, M.; Llobet, J.M.; Lamuela-Raventós, R.M. Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *Food Chem.* **2015**, *181*, 146–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Regueiro, J.; Sánchez-González, C.; Vallverdú-Queralt, A.; Simal-Gándara, J.; Lamuela-Raventós, R.; Izquierdo-Pulido, M. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. *Food Chem.* **2014**, *152*, 340–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sasot, G.; Martínez-Huélamo, M.; Vallverdú-Queralt, A.; Mercader-Martí, M.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Identification of phenolic metabolites in human urine after the intake of a functional food made from grape extract by a high resolution LTQ-Orbitrap-MS approach. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 435–444. [[CrossRef](#)]
28. Fayeulle, N.; Vallverdú-Queralt, A.; Meudec, E.; Hue, C.; Boulanger, R.; Cheynier, V.; Sommerer, N. Characterization of new flavan-3-ol derivatives in fermented cocoa beans. *Food Chem.* **2018**, *259*, 207–212. [[CrossRef](#)]
29. Vallverdú-Queralt, A.; Meudec, E.; Eder, M.; Lamuela-Raventós, R.M.; Sommerer, N.; Cheynier, V. The hidden face of wine polyphenol polymerization highlighted by high-resolution mass spectrometry. *ChemistryOpen* **2017**, *6*, 336–339. [[CrossRef](#)]
30. Vallverdú-Queralt, A.; Meudec, E.; Eder, M.; Lamuela-Raventós, R.M.; Sommerer, N.; Cheynier, V. Targeted filtering reduces the complexity of UHPLC-Orbitrap-HRMS data to decipher polyphenol polymerization. *Food Chem.* **2017**, *227*, 255–263. [[CrossRef](#)]
31. Di Lecce, G.; Arranz, S.; Jáuregui, O.; Tresserra-Rimbau, A.; Quifer-Rada, P.; Lamuela-Raventós, R.M. Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albarniño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chem.* **2014**, *145*, 874–882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Godevac, D.; Tešević, V.; Veličković, M.; Vujisica, L.; Vajs, V.; Milosavljević, S. Polyphenolic compounds in seeds from some grape cultivars grown in Serbia. *J. Serbian Chem. Soc.* **2010**, *75*, 1641–1652. [[CrossRef](#)]
33. Pugajeva, I.; Perkons, I.; Górnas, P. Identification and determination of stilbenes by Q-TOF in grape skins, seeds, juice and stems. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *74*, 44–52. [[CrossRef](#)]
34. Teixeira, N.; Mateus, N.; de Freitas, V.; Oliveira, J. Wine industry by-product: Full polyphenolic characterization of grape stalks. *Food Chem.* **2018**, *268*, 110–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rockenbach, I.I.; Jungfer, E.; Ritter, C.; Santiago-Schübel, B.; Thiele, B.; Fett, R.; Galensa, R. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSⁿ and LC-ESI-FTICR-MS. *Food Res. Int.* **2012**, *48*, 848–855. [[CrossRef](#)]
36. Perestrelo, R.; Lu, Y.; Santos, S.A.O.; Silvestre, A.J.D.; Neto, C.P.; Câmara, J.S.; Rocha, S.M. Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ: Novel phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. grape. *Food Chem.* **2012**, *135*, 94–104. [[CrossRef](#)]
37. Tinikul, R.; Chenprakhon, P.; Maenpuen, S.; Chaiyen, P. Biotransformation of plant-derived phenolic acids. *Biotechnol. J.* **2018**, *13*, 1–12. [[CrossRef](#)]
38. Saibabu, V.; Fatima, Z.; Khan, L.A.; Hameed, S. Therapeutic potential of dietary phenolic acids. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2015**, *2015*, 1–10. [[CrossRef](#)]
39. Moreira, M.M.; Barroso, M.F.; Porto, J.V.; Ramalhosa, M.J.; Švarc-Gajić, J.; Estevinho, L.; Morais, S.; Delerue-Matos, C. Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds. *Sci. Total Environ.* **2018**, *634*, 831–842. [[CrossRef](#)]
40. Hooi Poay, T.; Sui Kiong, L.; Cheng Hock, C. Characterisation of galloylated cyanogenic glucosides and hydrolysable tannins from leaves of *Phyllagathis rotundifolia* by LC-ESI-MS/MS. *Phytochem. Anal.* **2011**, *22*, 516–525. [[CrossRef](#)]
41. Sun, J.; Liang, F.; Bin, Y.; Li, P.; Duan, C. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. *Molecules* **2007**, *12*, 679–693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Gasperotti, M.; Masuero, D.; Vrhovsek, U.; Guella, G.; Mattivi, F. Profiling and accurate quantification of Rubus ellagitannins and ellagic acid conjugates using direct uplc-q-tof hdms and hplc-dad analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4602–4616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Heleno, S.A.; Martins, A.; Queiroz, M.J.R.P.; Ferreira, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chem.* **2015**, *173*, 501–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Taofiq, O.; González-Paramás, A.M.; Barreiro, M.F.; Ferreira, I.C.F.R.; McPhee, D.J. Hydroxycinnamic acids and their derivatives: Cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. *Molecules* **2017**, *22*, 281. [[CrossRef](#)]
45. Khoza, B.S.; Gbashi, S.; Steenkamp, P.A.; Njobeh, P.B.; Madala, N.E. Identification of hydroxycinnamoyl tartaric acid esters in *Bidens pilosa* by UPLC-tandem mass spectrometry. *S. Afr. J. Bot.* **2016**, *103*, 95–100. [[CrossRef](#)]
46. Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1094–1117. [[CrossRef](#)]
47. Bonn, G.K. Structural elucidation of catechin and epicatechin in sorrel leaf extracts using liquid-chromatography coupled to diode array-, fluorescence-, and mass Original Paper. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 524–528.
48. Bravo, M.N.; Silva, S.; Coelho, A.V.; Boas, L.V.; Bronze, M.R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 84–92. [[CrossRef](#)]
49. De Villiers, A.; Venter, P.; Pasch, H. Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1430*, 16–78. [[CrossRef](#)]
50. Yan, T.; Hu, G.; Wang, A.; Hong, Y. Formerly natural product letters characterisation of proanthocyanidins from *Schisandra chinensis* seed coats by UPLC-QTOF/MS. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 1834–1842. [[CrossRef](#)]
51. Prodanov, M.; Vacas, V.; Hernández, T.; Estrella, I.; Amador, B.; Winterhalter, P. Chemical characterisation of Malvar grape seeds (*Vitis vinifera* L.) by ultrafiltration and RP-HPLC-PAD-MS. *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *31*, 284–292. [[CrossRef](#)]
52. Delcambre, A.; André, Y.; Saucier, C. Sequencing of red wine proanthocyanidins by UHPLC-ESI-Q-ToF. *J. Appl. Bioanal.* **2015**, *1*, 46–54. [[CrossRef](#)]
53. Dou, J.; Lee, V.S.Y.; Tzen, J.T.C.; Lee, M.R. Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7462–7468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Liu, H.; Zou, T.; Gao, J.; Gu, L. Depolymerization of cranberry procyanidins using (+)-catechin, (–)-epicatechin, and (–)-epigallocatechin gallate as chain breakers. *Food Chem.* **2013**, *141*, 488–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Jaiswal, R.; Jayasinghe, L.; Kuhnert, N. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the Rhododendron genus (Ericaceae) by tandem LC-MS. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 502–515. [[CrossRef](#)]
56. Li, H.; Deinzer, M.L. Tandem Mass Spectrometry for Sequencing Proanthocyanidins. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1739–1748. [[CrossRef](#)]
57. Li, F.; Wang, Y.; Li, D.; Chen, Y.; Qiao, X.; Fardous, R.; Lewandowski, A.; Liu, J.; Chan, T.H.; Dou, Q.P. Perspectives on the recent developments with green tea polyphenols in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2018**, *13*, 643–660.
58. Higdon, J.V.; Frei, B. Tea Catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2003**, *43*, 89–143. [[CrossRef](#)]
59. Sur, S.; Panda, C.K. Molecular aspects of cancer chemopreventive and therapeutic efficacies of tea and tea polyphenols. *Nutrition* **2017**, *43*, 8–15. [[CrossRef](#)]
60. Singh, N.A.; Mandal, A.K.A.; Khan, Z.A. Potential neuroprotective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Nutr. J.* **2016**, *15*, 1–17. [[CrossRef](#)]
61. Pantelić, M.M.; Dabić Zagorac, D.; Davidović, S.M.; Todić, S.R.; Bešlić, Z.S.; Gašić, U.M.; Tešić, Ž.L.; Natić, M.M. Identification and quantification of phenolic compounds in berry skin, pulp, and seeds in 13 grapevine varieties grown in Serbia. *Food Chem.* **2016**, *211*, 243–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Takemoto, M.; Takemoto, H. Synthesis of theaflavins and their functions. *Molecules* **2018**, *23*, 918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Gu, L.; Kelm, M.A.; Hammerstone, J.F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Prior, R.L. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7513–7521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Teixeira, N.; Azevedo, J.; Mateus, N.; De Freitas, V. Proanthocyanidin screening by LC-ESI-MS of Portuguese red wines made with teinturier grapes. *Food Chem.* **2016**, *190*, 300–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Friedrich, W.; Eberhardt, A.; Galensa, R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *211*, 56–64. [[CrossRef](#)]

66. Semwal, D.K.; Semwal, R.B.; Combrinck, S.; Viljoen, A. Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients* **2016**, *8*, 90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Medina Remon, A.; Estruch, R.; Tresserra-Rimbau, A.; Vallverdu-Queralt, A.; Lamuela-Raventos, R.M. The effect of polyphenol consumption on blood pressure. *Mini Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1137–1149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Aaby, K.; Ekeberg, D.; Skrede, G. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4395–4406. [[CrossRef](#)]
69. Rehman, K.; Chohan, T.A.; Waheed, I.; Gilani, Z.; Akash, M.S.H. Taxifolin prevents postprandial hyperglycemia by regulating the activity of α -amylase: Evidence from an in vivo and in silico studies. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 425–438. [[CrossRef](#)]
70. Tresserra-Rimbau, A.; Guasch-Ferre, M.; Salas-Salvado, J.; Toledo, E.; Corella, D.; Castaner, O.; Guo, X.; Gomez-Gracia, E.; Lapetra, J.; Aros, F.; et al. Intake of total polyphenols and some classes of polyphenols is inversely associated with diabetes in elderly people at high cardiovascular disease risk. *J. Nutr.* **2016**, *146*, 767–777.
71. Yang, P.; Xu, F.; Li, H.; Wang, Y.; Li, F.; Shang, M.; Liu, G.; Wang, X.; Cai, S. Detection of 191 taxifolin metabolites and their distribution in rats using HPLC-ESI-IT-TOF-MS. *Molecules* **2016**, *21*, 1209.
72. Zhao, M.; Xu, J.; Qian, D.; Guo, J.; Jiang, S.; Shang, E. Identification of astilbin metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS. *Biomed. Chromatogr.* **2014**, *28*, 1024–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Lee, S.E.; Yang, H.; Son, G.W.; Park, H.R.; Park, C.; Jin, Y.; Park, Y.S. Eriodictyol protects endothelial cells against oxidative stress-induced cell death through modulating ERK/Nrf2/ARE-dependent heme oxygenase-1 expression. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 14526–14539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Fabre, N.; Rustan, I.; De Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 707–715. [[CrossRef](#)]
75. Pawlus, A.D.; Sahli, R.; Bisson, J.; Rivière, C.; Delaunay, J.C.; Richard, T.; Gomès, E.; Bordenave, L.; Waffo-Tégou, P.; Mérillon, J.M. Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 501–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Catalgol, B.; Batirel, S.; Taga, Y.; Ozer, N.K. Resveratrol: French paradox revisited. *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 1–18. [[CrossRef](#)]
77. Buiarelli, F.; Coccioli, F.; Jasionowska, R.; Merolle, M.; Terracciano, A. Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 2955–2964. [[CrossRef](#)]
78. Moss, R.; Mao, Q.; Taylor, D.; Saucier, C. Investigation of monomeric and oligomeric wine stilbenoids in red wines by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 1815–1827. [[CrossRef](#)]
79. Mattivi, F.; Vrhovsek, U.; Malacarne, G.; Masuero, D.; Zulini, L.; Stefanini, M.; Mose, C.; Velasco, R.; Guella, G. Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid *Vitis vinifera* (Merzling $\times$ Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5364–5375. [[CrossRef](#)]
80. Kong, Q.J.; Ren, X.Y.; Hu, N.; Sun, C.R.; Pan, Y.J. Identification of isomers of resveratrol dimer and their analogues from wine grapes by HPLC/MSⁿ and HPLC/DAD-UV. *Food Chem.* **2011**, *127*, 727–734. [[CrossRef](#)]
81. Cichewicz, R.H.; Kouzi, S.A.; Hamann, M.T. Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 29–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Vallverdú-Queralt, A.; Jáuregui, O.; Medina-Remón, A.; Andrés-Lacueva, C.; Lamuela-Raventós, R.M. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2986–2992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

83. Puessa, T.; Floren, J.; Kuldkepp, P.; Raal, A. Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7488–7494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples are not available from the authors.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.2 CAPÍTULO 2: EXTRACCIÓN A ESCALA DE PLANTA PILOTO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE SARMIENTOS DE VID:

CARACTERIZACIÓN INTEGRAL POR LC-ESI-LTQ-ORBITRAP-MS.

Artículo titulado: “Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from grape canes: Comprehensive characterization by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS”

Autores: **Danilo Escobar-Avello**, Claudia Mardones, Vania Sáez, Sebastián Riquelme, Dietrich von Baer, Rosa M. Lamuela-Raventós, Anna Vallverdú-Queralt

Revista: *Food Research International* 143 (2021) 110265.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110265>

RESUMEN:

Los sarmientos de vid, también llamados cañas de uva, son subproductos vitivinícolas muy conocidos que contienen altos niveles de compuestos fenólicos, los que están asociados con una amplia gama de beneficios para la salud. En este trabajo se extrajeron sarmientos de vid (*Vitis vinífera* cv. Pinot Noir) en un reactor de planta piloto de 750 L bajo las siguientes condiciones: temperatura 80 °C, tiempo 100 minutos y relación sólido/líquido 1:10. La caracterización integral de los compuestos fenólicos de la caña de uva se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas LTQ-Orbitrap de alta resolución / medición de masa precisa. Se identificaron un total de 44 compuestos y, de ellos 26 fueron también cuantificados, estos estaban constituidos por ácidos fenólicos y aldehídos (17), flavonoides (12) y estilbenoides (15). La clase más abundante de compuestos fenólicos fueron los estilbenoides, entre los cuales (*E*)- ϵ -viniferina predominaba. El perfil fenólico de los sarmientos de vid obtenido mediante la extracción a escala de planta piloto difirió significativamente de los resultados previos obtenidos a escala de laboratorio. Adicionalmente, observamos una alta capacidad antioxidante del extracto de sarmientos a escala de planta piloto, la que fue medida por el potencial de eliminación de radicales antioxidantes (ABTS^{•+}) ($2209 \pm 125 \mu\text{mol TE/g DW}$) y por absorbancia de radicales de oxígeno usando fluoresceína (ORAC-FL) ($4612 \pm 155 \mu\text{mol de TE/g DW}$). El extracto de sarmientos a escala de planta piloto por su perfil fenólico puede utilizarse como subproducto para el desarrollo de nuevos productos nutraceuticos y farmaceuticos, mejorando el valor y la sostenibilidad de estos residuos.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from grape canes: Comprehensive characterization by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS

Danilo Escobar-Avello^{a,b}, Claudia Mardones^{c,1,*}, Vania Saéz^c, Sebastián Riquelme^{b,c}, Dietrich von Baer^c, Rosa M. Lamuela-Raventós^{a,d}, Anna Vallverdú-Queralt^{a,d,1,*}

^a Department of Nutrition, Food Science and Gastronomy, School of Pharmacy and Food Sciences and XaRTA, Institute of Nutrition and Food Safety (INSA-UB), University of Barcelona, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

^b Unidad de Desarrollo Tecnológico, Universidad de Concepción, 4191996 Coronel, Chile

^c Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Casilla 237, Correo 3, Concepción, Chile

^d Consorcio CIBER, M.P. Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Pilot-plant scale extraction
Agro-food residue valorization
By-products
Polyphenols
Phenolic compounds
Stilbenes
Vinyferin
Grape canes
Vine shoots
LTQ-Orbitrap-MS

ABSTRACT

Grape canes, also named vine shoots, are well-known viticultural byproducts containing high levels of phenolic compounds, which are associated with a broad range of health benefits. In this work, grape canes (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) were extracted in a 750 L pilot-plant reactor under the following conditions: temperature 80 °C, time 100 min, solid/liquid ratio 1:10. The comprehensive characterization of grape cane phenolic compounds was performed by liquid chromatography coupled to high-resolution/accurate mass measurement LTQ-Orbitrap mass spectrometry. A total of 44 compounds were identified and, 26 of them also quantified, consisting of phenolic acids and aldehydes (17), flavonoids (12), and stilbenoids (15). The most abundant class of phenolics were stilbenoids, among which (*E*)-*vinyferin* predominated. The phenolic profile of grape canes obtained using pilot plant extraction differed significantly from the results of laboratory-scale studies obtained previously. Additionally, we observed a high antioxidant capacity of grape cane pilot-plant extract measured by the radical antioxidant scavenging potential (ABTS^{•+}) (2209 ± 125 μmol TE/g DW) and oxygen radical absorbance capacity using fluorescein (ORAC-FL) (4612 ± 155 μmol TE/g DW). Grape cane pilot-plant extract for their phenolic profile may be used as a by-product for the development of novel nutraceutical and pharmaceutical products, improving the value and the sustainability of these residues.

1. Introduction

Grape canes from *Vitis vinifera* L. are an abundant viticultural byproduct generated after grapevine pruning. Their production is estimated to range from 2 to 4 tons per hectare of vineyard (Dávila, Gullón, Luis Alonso, Labidi, & Gullón, 2018). According to data from the International Organization of Vine and Wine (OIV), 7.4 million hectares are dedicated to vineyard cultivation in the world (OIV, 2020). Consequently, approximately 14.8–29.6 million tons of grape canes are generated each year worldwide. Grape canes, which are usually burned or incorporated into the vineyard soil, are considered to be an undervalued residue. From the viewpoint of integrated biorefinery and

circular economy, they are potentially a high-value resource due to their attractive chemical composition and possible industrial applications. For instance, grape canes can be used as a food ingredient, based on a commercial product called Vineatrol®30, developed and manufactured by Actichem (Montauban, France).

As well as biopolymers such as lignin, cellulose, and hemicellulose, grape canes contain phytochemicals, mainly polyphenols (Riquelme et al., 2019). A procedure to recover the polymeric fraction from vine shoots, including hemicellulosic oligosaccharides, lignin fragments, and cellulosic substrates, has been proposed by Dávila et al. (2017). In the same direction, biopolymers such as cellulose, hemicellulose, lignin, and polyflavonoids from diverse woody resources have been extensively

* Corresponding authors at: Department of Nutrition, Food Science and Gastronomy, School of Pharmacy and Food Sciences and XaRTA, Institute of Nutrition and Food Safety (INSA-UB), University of Barcelona, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain (A. Vallverdú-Queralt). Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Casilla 237, Correo 3, Concepción, Chile (C. Mardones).

E-mail addresses: cmardone@udec.cl (C. Mardones), avallverdu@ub.edu (A. Vallverdú-Queralt).

¹ The work was co-directed by both authors.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110265>

Received 22 October 2020; Received in revised form 19 February 2021; Accepted 21 February 2021

Available online 6 March 2021

0963-9969/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

studied as bio-based materials with novel applications (Díaz-Galindo et al., 2020; García et al., 2018; García, Gavino, Escobar, & Cancino, 2017; Peredo et al., 2015). Grape canes, however, have been studied principally for the recovery of phenolic compounds (Moreira et al., 2018; Zwingelstein, Draye, Besombes, Piot, & Chatel, 2020).

Grape canes have heterogeneous phenolic profiles, including phenolic acids, flavanols, flavonols, flavanonols, flavanones, and stilbenoids, the most abundant being flavanols and oligomeric stilbenes (Escobar-Avello et al., 2019). Many of these phenolic compounds have promising biological activities. Besides their antimicrobial, antioxidant, anti-cancer, and cardio-protective properties, tannins seem to exert beneficial effects on metabolic disorders and protect against many oxidative stress-related diseases (Smeriglio, Barreca, Bellocchio, & Trombetta, 2017). Stilbenes, particularly resveratrol, have a wide range of benefits for human health, such as antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer properties (Ramírez-Garza et al., 2018). Stilbenes can undergo polymerization by oxidative coupling of two to eight units of monomers and these derivatives may exhibit higher activity, stability, and selectivity than resveratrol (Xue et al., 2014).

The stilbene profile of grape canes strongly depends on the cultivar (Lambert et al., 2013), geographic growing area (Vergara et al., 2012), and duration of post-pruning storage (Gorena et al., 2014). Pinot noir canes in particular contain high levels of resveratrol and viniferin (Lambert et al., 2013; Vergara et al., 2012), which can increase five-fold after three months of post-pruning storage (Gorena et al., 2014). The yields of phenolic compounds may also be influenced by extraction methods and specific experimental conditions, such as the particle size of raw material, temperature, extraction time, and solvent composition. A recent review article summarizes the extraction methods and the influence of extraction parameters on polyphenol recovery from grape canes (Zwingelstein et al., 2020).

Over the last decade, the most investigated method to recover polyphenols from grape canes has been conventional extraction using mixtures of aqueous ethanol as the solvent. Emerging techniques, such as ultrasound-assisted (Piñeiro, Marrufo-Curtido, Serrano, & Palma, 2016), microwave-assisted (Moreira et al., 2018), or pressurized low polarity water extraction (Turgut, Feyissa, Baltacıoğlu, Küçüköner, & Karacabey, 2020), are being studied to enhance resveratrol and viniferin recovery from grape canes. However, although less time-consuming, these new methods are not necessarily more efficient than the conventional approaches (Zwingelstein et al., 2020). Their application in the industrial field is still in its early days and much more research needs to be done. On the other hand, few studies have been performed on a bench-, pilot-plant scale, or above for grape canes using mixtures of ethanol and water (Dorosh et al., 2020; Riquelme et al., 2019).

The ultimate objective of the study was to gain new knowledge about scaling up the extraction process of phenolic compounds from grape canes and thus facilitate their industrial application in the fields of food, cosmetics, biomaterials, and other bio-based products. Consequently, a comprehensive identification of polyphenols in grape cane extracts produced in a pilot-plant reactor, using liquid chromatography hybrid linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry (LC-LTQ-Orbitrap-MS) analysis was performed. Additionally, the levels of phenolic compounds were quantified, and the reactions involved in the extraction process are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Light exposure was avoided when manipulating the standards. Gallic, 4-hydroxybenzoic, and ellagic acids, catechin, epicatechin, (*E*)-resveratrol, (*E*)- ϵ -viniferin, eriodictyol, taxifolin, quercetin-3-*O*-glucoside, and quercetin-3-*O*-glucuronide were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Gallic acid ethyl ester (ethylgallate) and kaempferol-3-*O*-glucoside were acquired from Extrasynthèse (Genay,

France).

HPLC grade acetonitrile, formic acid, ethanol, and water were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was generated by a Milli-Q water purification system (Millipore Bedford, MA, USA). Potable ethanol (96°) from molasses employed for pilot plant scale extraction was purchased from Oxiquim S.A. (Coronel, Chile).

2.2. Grape canes: Collection and preparation

Grape canes (*V. vinifera* L. cv. Pinot noir) were collected from vines in an organic vineyard at Viña De Neira, located in Ránquil, Itata Valley, Biobío region, in Southern Chile (36°36'50.33" S, 72°39'40.63" W at 279 m of altitude).

After pruning, all samples were cut in 30–50 cm pieces and stored for 3 months at room temperature (19 °C $\pm$ 5) and 30–70% relative humidity, in accordance with a Chilean patent (Riquelme et al., 2019). From a total of 500 kg wet sample, 67 kg of dry grape canes were used for the pilot plant extraction. Before extraction, the grape canes were chopped in a Retsch grinder (model SM) at 300–2000 rpm until particle size was below 1 cm.

2.3. Pilot plant scale extraction

Grape cane extraction was performed on a pilot-plant scale at 80 °C for 100 min, based on a previous bench-scale optimization study (Riquelme et al., 2019). Extractions were carried out in a 750 L stainless-steel reactor using ethanol/water solution (80:20 v/v). Fig. 1 shows the pilot plant extraction process.

After extraction, the solvent was evaporated under vacuum (absolute pressure 0.05 bar) to remove and recover the ethanol through a distillation process. The extract was then spray-dried using a BHS Büttner-Schilde-Haas AG dryer, and stored in the dark at 4 °C.

The whole extraction yield was 5.45 (w/w) calculated as % grams of extract/gram of dry grape canes.

2.4. Phenolic profile by LC-LTQ-Orbitrap-MS

Identification and quantification of phenolic compounds in the pilot plant extract was performed by liquid chromatography analysis coupled to high resolution mass spectrometry. An Accela chromatograph (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with a photodiode array detector (PDA), a quaternary pump, and a thermostated autosampler was employed. Chromatographic separation was carried out on an Atlantis T3 Column 2.1 $\times$ 100 mm, 3 μ m (Waters, Milford, MA, USA). Gradient elution was performed with water/0.1% formic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B) at a constant flow rate of 350 μ L/min, and the injection volume was 10 μ L. The gradient employed was 0 min, 2% B; 0–2 min, 8% B; 2–12 min, 20% B; 12–13 min, 30% B; 13–14 min, 100% B; 14–17 min, 100% B; and 17–18 min, 2% B. The column was equilibrated for 5 min returning to initial conditions.

For accurate mass measurements, the LC system was coupled to an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK), equipped with an electrospray ionization source. The mass spectrometer was operated in the negative mode, and particular parameters were as follows: source voltage, 3 kV; sheath gas, 50 a.u. (arbitrary units); auxiliary gas, 20 a.u.; sweep gas, 2 a.u.; and capillary temperature, 375 °C. Pilot plant extracts were investigated in FTMS mode at a resolving power of 30,000 (FWHM at m/z 400) and data-dependent MS/MS events collected at a resolving power of 15,000. The most intense ions detected in the FTMS spectrum were selected for the data-dependent scan. Parent ions were fragmented by high-energy collisional dissociation with normalized collision energy of 35% and an activation time of 10 ms. The mass range in FTMS mode was from m/z 100 to 1500. LC-LTQ-Orbitrap-MS parameters were adapted from a previous study with some modifications (Escobar-Avello et al., 2019). The data analyses and instrument control were performed with Xcalibur

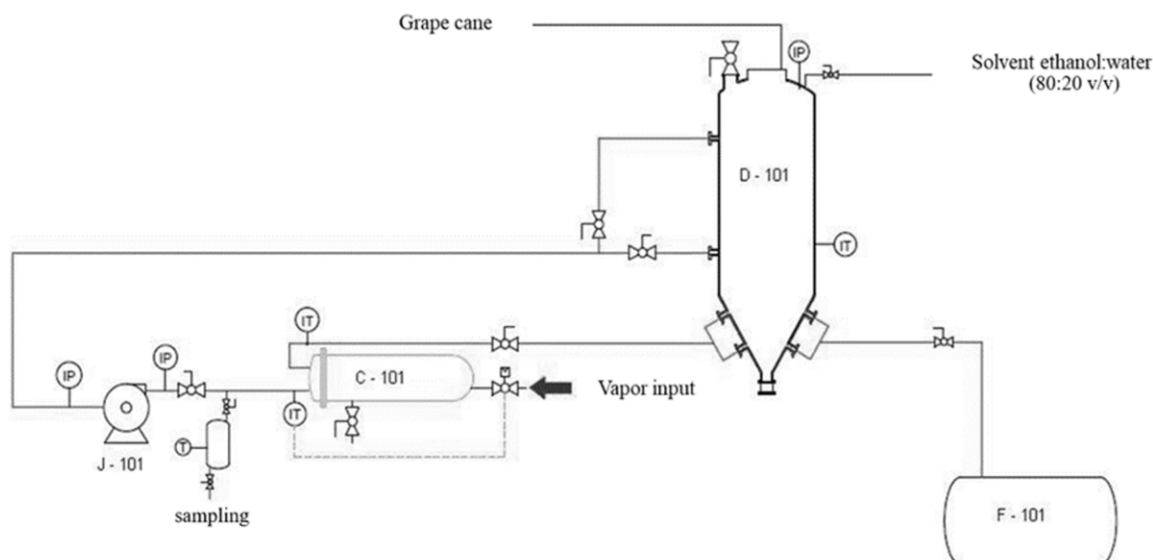


Fig. 1. Flowchart of grape cane extraction process in a pilot plant designed by the AutoCAD P&ID (v. 64 bits) program. Principal equipment: D-101 steel reactor (750 L); C-101 heat exchanger; J-101 Pump; F-101 steel tank.

3.0 software (Thermo Fisher Scientific).

Individual compounds were semi-quantified using pure standards when available or the most similar compound. Some analytes, such as glycosylated forms, dimers, or oligomers, were semi-quantified using the aglycon form or the monomer (Heras et al., 2016). The analytical parameters of the calibration curves are shown in Table 1.

2.5. Antioxidant capacity assay

Antioxidant capacity of grape cane pilot-plant extract was performed, according to the method reported by Sáez et al. (2018a). The analysis was completed in microplates of 96-well- using a microplate reader (Synergy/HTX multi-mode reader, BioTeK, Winooski, Vermont, USA). An ABTS^{•+} (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) solution (7.5 mM) with K₂S₂O₈ (2.5 mM) was diluted with ethanol to obtain an absorbance of 0.7 at 734 nm. Into each well, 190 µL of diluted ABTS^{•+} radical solution was added. After incubation at 5 min and 30 °C, the first read was performed at 734 nm. The sample or Trolox calibration point (10 µL) were added, then the well-plate was incubated for 20 min at 30 °C. The assay of oxygen radical absorbance capacity using fluorescein (ORAC-FL)- was conducted according to the method reported by Ou et al. (2013). The calibration curves were prepared with Trolox, and results reported as µmol Trolox equivalents (TE)/g DW. All assays were performed in triplicate and protected from light.

3. Results and discussion

3.1. Identification of phenolic compounds

Table 2 shows the 44 phenolic compounds detected in the grape cane extract produced under pilot plant conditions and identified through LC-

LTQ-Orbitrap-MS. The main classes of phenolic compounds identified were phenolic acids and aldehydes (17), flavonoids (12), and stilbenes (15). Several of these compounds have been previously identified in grape canes (Escobar-Avello et al., 2019). However, to the best of our knowledge, this is the first time that the phenolic profile of grape canes extracted at pilot plant level has been comprehensively characterized by high-resolution mass spectrometry.

3.1.1. Phenolic acids and aldehydes

Phenolic acids were the most diverse class of phenolic compounds found in the grape cane extracts. Monogalloyl-glucose (*m/z* 331.0668), gallic acid (*m/z* 169.0141), protocatechuic acid-*O*-hexoside isomer 1 and 2 (*m/z* 315.0719, *t_R*. 7.39 min; *m/z* 315.0718, *t_R*. 8.52 min), protocatechuic acid (*m/z* 153.0192), syringic acid hexoside (*m/z* 359.0981), hydroxybenzoyl hexoside (*m/z* 299.0770), 4-hydroxybenzoic acid (*m/z* 137.0243), ellagic acid hexoside (*m/z* 463.0518), and gallic acid ethyl ester (*m/z* 197.0453) were identified by the typical loss of CO₂ [*M* – H–44][–]. Phenolic acid hexosides also showed the characteristic cleavage of their hexose moiety [*M* – H–162][–]. Additionally, gallic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and gallic acid ethyl ester were identified by comparison with their corresponding pure standards.

Two hydroxycinnamic acids were tentatively identified based on their accurate mass measurements and MS² fragments. Caftaric acid (*m/z* 311.0406) showed ions at *m/z* 179.0342 (caffeic acid) and 149.0085 (tartaric acid), owing to the loss of a tartaric acid moiety (132 Da) and the presence of a tartaric acid molecule, respectively. Coumaric acid (*m/z* 295.0457) was tentatively identified based on the loss of the tartaric acid (132 Da) and the presence of an ion at *m/z* 163.0391, due to the presence of a coumaric acid molecule.

Ellagic acid (*m/z* 300.9986) and ellagic acid pentoside (*m/z* 433.0410) were also identified. Ellagic acid produced three fragment

Table 1
Analytical parameters for phenolic compound quantification using HPLC–MS/MS.

Compound	<i>t_R</i> (min)	Accurate mass	Calibration curve	R ²	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Gallic Acid	4.29	169.0141	y = 353688 + 717410x	0.9999	0.215	0.652
Epicatechin	13.36	289.0714	y = 1458160 + 1764540x	0.9880	0.864	2.620
Taxifolin	17.03	303.0506	y = 172319 + 259345x	0.9980	0.523	1.584
Eriodictyol	21.07	287.0555	y = 1162620 + 1484100x	0.9819	1.111	3.368
Resveratrol	20.28	227.0709	y = 6536890 + 2896920x	0.9991	0.617	1.870
(<i>E</i>)- <i>e</i> -viniferin	21.69	453.1336	y = 2470030 + 1252110x	0.9892	1.781	5.396

t_R, retention times; R², correlation coefficients; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification.

Table 2

Identification of phenolic compounds in the grape cane pilot plant extract using LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS in negative mode.

Compounds	t _R (min)	Accurate mass	Theoretical Mass	Error (ppm)	MS/MS ions (% intensity)	Molecular Formula
PHENOLIC ACIDS AND ALDEHYDES						
Monogalloyl-glucose	3.63	331.0668	331.0671	−0.87	169.0134(100), 125.0237(10.12)	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀
Gallic acid*	4.29	169.0141	169.0142	−1.04	125.0239(100)	C ₇ H ₆ O ₅
Protocatechuic acid-O-hexoside (1)	7.39	315.0719	315.0722	−0.67	153.0186(100), 109.0290(11.78)	C ₁₃ H ₁₆ O ₉
Protocatechuic acid	7.67	153.0192	153.0193	−0.97	109.0290(100)	C ₇ H ₆ O ₄
Protocatechuic acid-O-hexoside (2)	8.52	315.0718	315.0722	−1.01	153.0186(100), 109.0290(8.15)	C ₁₃ H ₁₆ O ₉
Syringic acid hexoside	8.76	359.0981	359.0984	−0.63	197.0446(100)	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀
Caftaric acid	9.27	311.0406	311.0409	−0.88	149.0085(100), 179.0342(41.55)	C ₁₃ H ₁₂ O ₉
Protocatechuic aldehyde	9.47	137.0242	137.0244	−1.33	93.0343(100), 109.0291(81.93)	C ₇ H ₆ O ₃
Hydroxybenzoyl hexoside	9.95	299.0770	299.0772	−0.73	137.0237(100)	C ₁₃ H ₁₆ O ₈
4-Hydroxybenzoic acid*	10.04	137.0243	137.0244	−1.03	93.0340(100)	C ₇ H ₆ O ₃
Coutaric acid	11.17	295.0457	295.0459	−0.95	163.0391(100)	C ₁₃ H ₁₂ O ₈
Hydroxybenzaldehyde	11.75	121.0294	121.0295	−1.13	93.0296(100)	C ₇ H ₆ O ₂
Ellagic acid hexoside	14.00	463.0518	463.0518	0.05	300.9975(100)	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₃
Gallic acid ethyl ester*	14.30	197.0453	197.0455	−1.00	169.0134(100), 125.0239(6.85)	C ₉ H ₁₀ O ₅
Ellagic acid pentoside	16.03	433.0410	433.0412	−0.53	300.9976(100), 299.9899(46.54)	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂
Ellagic acid*	16.95	300.9986	300.9990	−1.26	257.0077(100), 229.0131(55.46), 185.0235(32.44)	C ₁₄ H ₆ O ₈
Ethyl protocatechuate	18.58	181.0504	181.0506	−1.30	153.0187(100), 152.0109(14.47), 109.0290(6.77)	C ₉ H ₁₀ O ₄
FLAVONOIDS						
Flavanols						
Catechin*	11.40	289.0715	289.0718	−0.75	245.0810(100), 205.0499(40.55), 179.0343(15.63)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Epicatechin*	13.36	289.0714	289.0718	−1.32	245.0807(100), 205.0496(37.72), 179.0340(15.86)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Procyanidin A-type dimer	15.80	575.1194	575.1195	−0.17	449.0856(100), 289.0710(32.12), 539.0912(25.78), 285.0390(21.75)	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂
Flavanones						
Eriodictyol-O-glucoside (1)	13.58	449.1090	449.1089	0.23	287.0546(100)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁
Eriodictyol-O-glucoside (2)	19.05	449.1089	449.1089	−0.17	287.0550(100), 151.0031(6.25)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁
Eriodictyol*	21.07	287.0555	287.0561	−2.20	151.0033(100), 135.0446(4.93)	C ₁₅ H ₁₂ O ₆
Flavanonols						
Taxifolin*	17.03	303.0506	303.0510	−1.50	285.0391(100), 177.0185(14.36), 125.0239(10.77)	C ₁₅ H ₁₂ O ₇
Astilbin (1)	17.39	449.1090	449.1089	0.10	303.0498(100), 285.0393(93.25), 151.0031(27.06)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁
Astilbin (2)	18.23	449.1084	449.1089	−1.19	303.0494(100), 285.0390(82.97), 151.0029(26.16)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁
Flavonols						
Quercetin-3-O-glucoside*	17.21	463.0879	463.0882	−0.72	301.0344(100), 300.0268(31.95)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
Quercetin-3-O-glucuronide*	17.28	477.0670	477.0675	−0.98	301.0340(100)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃
Kaempferol-3-O-glucoside*	18.41	447.0930	447.0933	−0.54	284.03113(100), 285.0391(73.74), 327.0496(16.43), 255.0287(10.42)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
STILBENES						
Resveratrol C-hexoside	13.68	389.1238	389.1242	−0.95	269.0807(100), 299.0810(2.61), 241.0857(2.42)	C ₂₀ H ₂₂ O ₈
Restrytol (A or B)	15.12	471.1442	471.1449	−1.48	255.0653(100), 377.1018(53.27), 349.1070(43.20)	C ₂₈ H ₂₄ O ₇
Oxyresveratrol	15.51	243.0659	243.0663	−1.48	201.0547(100), 109.0290(57.60), 199.0755(28.10), 215.0703(27.08), 157.0651(8.10)	C ₁₄ H ₁₂ O ₄
Oxidized stilbenoid dimer (1)	16.19	471.1449	471.1449	−0.06	349.1067(100)	C ₂₈ H ₂₄ O ₇
Stilbenoid dimer 1 (Caraphenol B/C)	17.81	469.1286	469.1293	−1.45	451.1183(100), 363.0870(38.83), 375.0867(28.66), 281.0448(1.28)	C ₂₈ H ₂₂ O ₇
Oxidized stilbenoid dimer (2)	18.90	471.1446	471.1449	−0.71	349.1070(100), 255.0654(20.66)	C ₂₈ H ₂₄ O ₇
Stilbenoid dimer 2 (heterodimer)	19.26	469.1288	469.1293	−0.92	363.0861(100), 375.0860(39.24), 451.1169(6.21)	C ₂₈ H ₂₂ O ₇
Pallidol	19.52	453.1341	453.1344	−0.52	359.0918(100), 265.0499(8.70)	C ₂₈ H ₂₂ O ₆
(E)-resveratrol*	20.28	227.0709	227.0714	−2.03	185.0600(100), 183.0808(37.78), 159.0809(28.91), 157.0653(23.39), 143.0497(16.53)	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Stilbene dimer (resveratrol dimer)	20.63	453.1338	453.1344	−1.26	359.0914(100), 289.0859(6.64)	C ₂₈ H ₂₂ O ₆
Stilbenoid trimer	20.77	681.2123	681.2130	−1.07	453.1324(100), 359.0906(72.94), 331.0963(62.31), 587.1672(26.06), 227.0702(24.41)	C ₄₂ H ₃₄ O ₉
Resveratrol dimer-O-hexoside	20.85	615.1866	615.1872	−1.02	453.1323(100)	C ₃₄ H ₃₂ O ₁₁
Stilbenoid dimer 3 (Scirpusin A)	21.31	469.1289	469.1293	−2.09	375.0861(100), 385.1067(52.43), 359.0913(36.46), 451.1172(22.49), 241.0497(16.56), 347.0912(12.55)	C ₂₈ H ₂₂ O ₇
Stilbenoid tetramer(Hopeaphenol/ Isohopeaphenol)	21.44	905.2580	905.2568	1.29	811.2148(100), 717.1739(71.83), 451.1164(10.45), 359.0908(7.98)	C ₅₆ H ₄₂ O ₁₂
(E)-ε-viniferin*	21.69	453.1336	453.1344	−1.58	359.0922(90.11), 347.0918(43.73), 435.1234(20.95)	C ₂₈ H ₂₂ O ₆

* Comparison with standard. t_R, retention times; Isomers are shown in the bracket.

ions at m/z 257.0077 (loss of CO₂), m/z 229.0131 (loss of CO₂ and CO), and m/z 185.0235 (loss of two CO₂ and one CO) (Yan, Yin, Ma, & Liu, 2014), and was further confirmed by comparison with its pure standard. Ellagic acid pentoside showed fragment ions at m/z 300.9976, due to the loss of a pentosyl unit (132 Da) (Gasperotti, Masuero, Vrhovsek, Guella, & Mattivi, 2010). The presence of gallic and ellagic acids indicated that grape canes contain hydrolyzable tannins (Luque-Rodríguez, Pérez-Juan, & Luque De Castro, 2006), which were hydrolyzed under the superheating conditions of pilot-plant extraction.

Two phenolic aldehydes were detected, hydroxybenzaldehyde (m/z

121.0294) and protocatechuic aldehyde (m/z 137.0242), which both gave the similar fragments at m/z 93.0296 and m/z 93.0343, arising from the losses of CO (28 Da) and CO₂ (44 Da) moieties, respectively. Furthermore, protocatechuic aldehyde showed a fragment at m/z 109.0291 corresponding to the loss of a carbon monoxide molecule. Phenolic aldehydes were probably generated by heat-induced lignin degradation (Luque-Rodríguez et al., 2006). A high percentage of lignin (38.7%) was observed in grape canes in a previous study (Riquelme et al., 2019).

Ethyl protocatechuate (m/z 181.0504) was also tentatively

identified. MS² of *m/z* 181.0504 produced ions at *m/z* 153.0187[M – CH₂CH₃]⁺ and *m/z* 109.0290[M – CH₂CH₃ – CO₂]⁺ (Baderschneider & Winterhalter, 2001). The presence of this compound could be attributed to the condensation of the protocatechuic acid with ethanol.

3.1.2. Flavonoids

This phenolic class is subdivided into subclasses of flavanols, flavanones, flavanonols, and flavonol derivatives.

Flavanols. Proanthocyanidins, also referred to as condensed tannins, have been extensively reported in grape canes (Cebrián-Tarancón et al., 2018a; Escobar-Avello et al., 2019; Montero, Sáez, von Baer, Cifuentes, & Herrero, 2018; Sáez et al., 2018b). However, in the grape cane pilot plant extract only three flavanols were detected in MS² mode.

The identification of catechin (*m/z* 289.0715) and epicatechin (*m/z* 289.0714) was confirmed by comparison with standards. These compounds have been previously reported in laboratory-scale grape cane extracts (Escobar-Avello et al., 2019).

A procyanidin A-type dimer (*m/z* 575.1194) was tentatively identified. The MS² spectrum of *m/z* 575.1194 showed ions at *m/z* 449.0856, 289.0710, 539.0912, and 285.0390. The ion at *m/z* 449.0856 corresponded to the elimination of a phloroglucinol (126 Da) molecule from the A-type dimer. The ions at *m/z* 289.0710 and 285.0390 arose from quinone methide cleavage of the A-type linkage (Li et al., 2012). The ion at *m/z* 539.0912 was attributed to the loss of two water molecules (36 Da). A procyanidin A-type dimer has not been previously detected in laboratory-scale grape cane extracts, although five type-B dimers (at *m/z* 577) were successfully identified (Escobar-Avello et al., 2019). A likely explanation is that B-type procyanidin dimers can be converted into A-type dimers by radical oxidation (Kondo et al., 2000; Osman & Wong, 2007). In addition, other studies have determined that the conversion is significantly affected by temperature and pH (Chen, Yuan, Chen, Jia, & Li, 2014). Therefore, the presence of a procyanidin A-type dimer in the extract was attributed to the oxidative environment in the pilot plant reactor.

The minor presence of oligomeric procyanidins and prodelphinidins contrasts with the results previously obtained on a laboratory scale (Escobar-Avello et al., 2019), and could be explained by the epimerization, hydrolysis, and oxidation/condensation reactions of the tannins caused by the temperature (80 °C) and oxygen in the pilot plant reactor. Similarly, flavan-3-ols could undergo oligo/polymerization under heat treatment (Fan et al., 2016). Polymerization and degradation processes of these compound classes have been previously studied by UHPLC-LTQ-Orbitrap-HRMS (Vallverdú-Queralt et al., 2017).

Flavanones. Eriodictyol and two of its glycoside isomers were detected. Eriodictyol (*m/z* 287.0555) revealed product ions at *m/z* 151.0033 and *m/z* 135.0446 corresponding to *retro*-Diels-Alder fragmentation in the C-ring, and was confirmed by comparison with the standard. Two eriodictyol-O-glucoside (*m/z* 449.1090, *t_R* 13.58 min; *m/z* 449.1089, *t_R* 19.05 min) generated ions at *m/z* 287.0546 and *m/z* 287.0550, respectively, and were tentatively identified based on accurate mass measures and cleavage of the glycoside moieties (162 Da).

Flavanonols. Taxifolin (*m/z* 303.0506) and two of its glycoside isomers, astilbin 1–2 (*m/z* 449.1090, *t_R* 17.39 min; *m/z* 449.1084, *t_R* 18.23 min), were identified. Both astilbin isomers exhibited cleavage of the rhamnosyl moiety (146 Da), generating ions at *m/z* 303.0498 and *m/z* 303.0494 (taxifolin), and ions at *m/z* 285.0393 and *m/z* 285.0390 due to the consecutive loss of a water molecule (18 Da). Taxifolin (or dihydroquercetin) was confirmed by comparison with its pure standard. These compounds were recently reported in grape canes (Escobar-Avello et al., 2019).

Flavonols. Quercetin-3-O-glucoside (*m/z* 463.0879), quercetin-3-O-glucuronide (*m/z* 477.0670), and kaempferol-3-O-glucoside (*m/z* 447.0930) were identified by comparison with pure standards. All have been previously reported in grape cane extracts (Escobar-Avello et al., 2019; Moreira et al., 2018). In a study of six onion varieties submitted to different temperatures, Sharma et al. (2015) reported that quercetin and

its glucoside derivatives increased at 120 °C, subsequently decreasing at 150 °C. Our results are consistent with these findings, as the flavanol glycosides were not affected by pilot plant extraction conditions.

3.1.3. Stilbenes

Stilbenoids, probably the most investigated phenolic group in grape canes, exhibit many patterns of oligomerization and glycosylation. Oligomeric stilbenes are generated by oxidative coupling of *trans*-resveratrol, isorhapontigenin, oxyresveratrol, or piceatannol (Rivière, Pawlus, & Mérillon, 2012).

(*E*)-resveratrol (*m/z* 227.0709) showed product ions at *m/z* 185.0600, 183.0808, 159.0809, 157.0653 and 143.0497 and was confirmed by comparing the retention time and MS² data with an authentic standard. Oxidation of resveratrol generates some well-known dimeric compounds and also other complex oxidized derivatives. Thus, although some compounds were tentatively identified by comparing accurate mass and fragmentation patterns with those in the literature, their precise structures should be elucidated by NMR spectroscopy techniques.

Oxyresveratrol (*m/z* 243.0659), two oxidized stilbenoid dimers (*m/z* 471.1449, *t_R* 16.19 min; *m/z* 471.1446, *t_R* 18.90 min), and restrytol A or B (*m/z* 471.1442) were tentatively identified in the grape cane pilot plant extract. Oxyresveratrol was identified by comparison with the mass spectra reported by Huang et al. (2010). The precursor ion at *m/z* 471.1442 of restrytol (A or B) showed product ions at *m/z* 377.1018, 349.1070, and 255.0653. The MS² of both oxidized stilbenoid dimers (*m/z* 471) showed an intense product ion at *m/z* 349.1067 and *m/z* 349.1070, while stilbenoid dimer 2 also gave a product ion at *m/z* 255.0654. Restrytol (A or B) and oxidized stilbenoid dimers have been previously identified in grape canes (Escobar-Avello et al., 2019).

(*E*)-*ε*-viniferin (*m/z* 453.1336) was verified by matching with a pure standard. The MS² of (*E*)-*ε*-viniferin showed ions at *m/z* 435.1234, 359.0922, and 347.0918. Pallidol (*m/z* 453.1341) was also tentatively identified by comparing the fragments with literature data (Flamini & De Rosso, 2018). The ion at *m/z* 265.0499 is characteristic of pallidol and could be essential for identification by mass spectrometry. An undefined stilbenoid dimer (*m/z* 453.1338) produced ions at *m/z* 359.0914, corresponding to the loss of a phenol (94 Da), and at *m/z* 289.0859, associated with the sequential losses of CO (28 Da) and H₂C = C = O (42 Da). The latter fragment has been observed for different regioisomers, such as parthenocissin A, quadrangularin A, and ampelopsin D (Flamini & De Rosso, 2018; Moss, Mao, Taylor, & Saucier, 2013).

Three dimers with [M – H][–] ion signals at *m/z* 469 were tentatively identified. Stilbenoid dimer 1 (*m/z* 469.1286) produced MS² ions at *m/z* 451.1183, 363.0870, 375.0867, and 281.0448, the latter reported by Püssa et al. (2006) for caraphenol. Caraphenol B and C were initially isolated from the roots of *Caragana sinica*, and their structures were elucidated through spectroscopic methods (Luo, Zhang, & Hu, 2001), only to be revised and then confirmed by synthesis (Snyder & Brill, 2011). Therefore, using our spectrometry approach, it was not plausible to assign the name of the structure with precision. Stilbenoid dimer 2 (*m/z* 469.1288) showed a similar fragmentation pattern, although with the absence of the ion at *m/z* 281.0448. Stilbenoid dimer 3 (*m/z* 469.1289) gave product ions at *m/z* 451.1172, 385.1067, 375.0861, 359.0913, 347.0912, and 241.0497. The product ion at *m/z* 241.0497 is characteristic of scirpusin A, as verified previously by NMR analysis (Sáez et al., 2018).

Two glycosylated stilbenes were tentatively identified by comparing their mass spectra with the literature (Escobar-Avello et al., 2019). Resveratrol C-hexoside (*m/z* 389.1238) showed fragment ions at *m/z* 269.0807, 299.0810, and 241.0857 corresponding to the losses of 120 Da and 90 Da, characteristic of C-hexosides. Resveratrol dimer-O-hexoside (*m/z* 615.1866) was also detected and gave an intense product ion at *m/z* 453.1323 arising from the loss of a sugar moiety (162 Da). Various resveratrol glycoside dimers have been experimentally

demonstrated by NMR in Riesling wine, including ϵ -viniferin diglucosides, and pallidol mono- and diglucosides (Baderschneider & Winterhalter, 2000). Likewise, a resveratrol *trans*-dehydrodimer (δ -viniferin) and its 11- and 11'- β -O-glucosides have been reported in cell suspension cultures of *V. vinifera* (Waffo-Teguo et al., 2001). The glycosylation of resveratrol may help to protect compounds from enzymatic oxidation and extend their half-life in cell tissues (Regev-Shoshani, Shoseyov, Bilkis, & Kerem, 2003).

A stilbenoid trimer (m/z 681.2123) was also tentatively identified, showing product ions at m/z 587.1672, 453.1324, 359.0906, 331.0963, and 227.0702, which were generated by the typical stilbenoid losses of a phenol (94 Da), a unit of resveratrol (228 Da), and a phenol group (94 Da) from the ion at m/z 453. The product ion at m/z 331.0963 was probably due to the loss of $C_7H_6O_2$ (122 Da) from m/z 453.1324 or a loss of CO (28 Da) from the ion at m/z 359.0906. Additionally, the presence of a deprotonated resveratrol unit was detected at m/z 227.0702. The proposed fragmentation pathway for the stilbenoid trimer (m/z 681.2123) is illustrated in Fig. 2.

A tentatively identified stilbenoid tetramer (m/z 905.2580) gave a mixed spectrum, apparently due to the co-elution of hopeaphenol and isohopeaphenol, which have been previously identified in grape canes (Escobar-Avello et al., 2019). The main product ions detected at m/z 811.2148, 717.1739, 451.1164, and 359.0908 were produced following the characteristic fragmentation pathway of stilbene oligomers (Moss et al., 2013).

The higher-order oligomers are often the product of either oxidative coupling to resveratrol/ ϵ -viniferin or an intermolecular Friedel–Crafts reaction (Keylor, Matsuura, & Stephenson, 2015). These routes can generate highly diverse and complex structures, entailing additional studies for the elucidation of the oligomers. Furthermore, several uncontrolled reactions could occur in the oxidative environment of the pilot-plant reactor leading to new and unknown compounds.

3.2. Concentrations of individual phenolic compounds in the grape cane pilot-plant extract.

The semi-quantification of phenolic compounds was performed by external calibration curves using six reference compounds. The linearity of the method obtained with a regression coefficient (R^2) was higher

than 0.9819. The LOD values range from 0.215 to 1.781 mg/L, whereas the LOQ values range from 0.652 to 5.396 mg/L (Table 1).

The main phenolic classes obtained in the grape cane pilot-plant extract were stilbenes (55%), phenolic acids and aldehydes (28%), and flavonoids (17%), as shown in Fig. 3 A. The individual semi-quantification of phenolic compounds in the grape cane extract obtained on a pilot-scale is presented in Fig. 3 C-E.

3.2.1. Phenolic acids and aldehydes

Phenolic acids found abundantly in agro-food waste have application in the cosmetic, pharmaceutical, and polymer industries (Tinikul, Chenprakhon, Maenpuen, & Chaiyen, 2018). They are also used in the food and beverage industry for their organoleptic, color, sensory, nutritional, and antioxidant properties (Valanciene et al., 2020).

The total amount of phenolic acids and aldehydes in the grape cane pilot-plant extract was 4117 ± 530 mg/kg DW (Fig. 3A). The predominant phenolic aldehyde was hydroxybenzaldehyde (1295 ± 131 mg/kg DW) (Fig. 3C), and the high amount of hydroxybenzaldehyde acid was likely due to the thermal degradation of lignin. Also detected in high levels was protocatechuic aldehyde (711 ± 100 mg/kg DW). Protocatechuic acid was previously quantified in grape canes at concentrations of 3 to 379 mg/kg (Luque-Rodríguez et al., 2006; Sánchez-Gómez et al., 2014). Protocatechuic aldehyde has been studied for its regulatory effects on myocardial fibrosis, which is associated with cardiovascular disease (Wan et al., 2019). Additionally, an isomer of protocatechuic acid-O-hexoside was quantified (388 ± 53 mg/kg DW).

The presence of hydrolyzable tannins in grape canes could be explained by the high levels of ellagic acid and gallic acid (Luque-Rodríguez et al., 2006), which were hydrolyzed by the pilot plant extraction conditions. Ellagic acid was observed in high levels (284 ± 7 mg/kg DW), representing a recovery up to 5-fold higher than values reported in previous studies (0.01 to 53.25 mg/kg) (Goufo et al., 2020). In contrast, the ellagic acid pentoside (164 ± 16 mg/kg DW) was detected in minor levels.

The concentration of gallic acid (279 ± 58 mg/kg DW) was in agreement with levels reported for different vine-shoot cultivars using superheated liquid extraction (Delgado-Torre, Ferreira-Vera, Priego-Capote, Pérez-Juan, & Luque De Castro, 2012). A derivative of gallic acid identified as gallic acid ethyl ester (ethyl gallate) was also detected

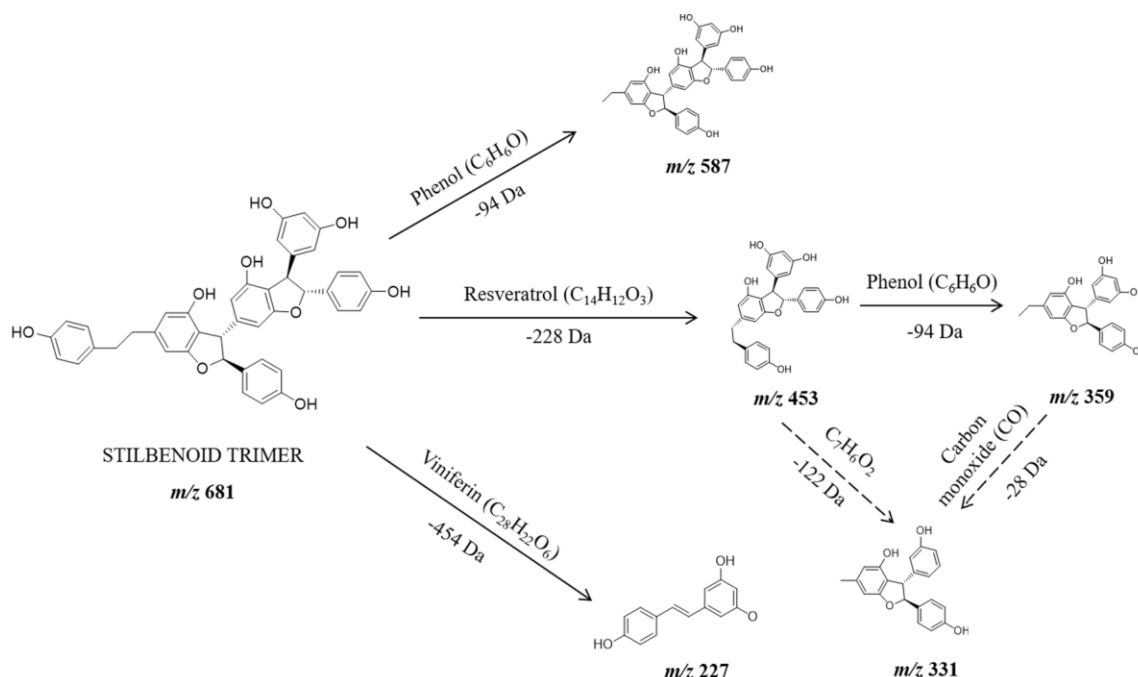


Fig. 2. Proposed fragmentation pathway for a stilbenoid trimer (m/z 681.2123).

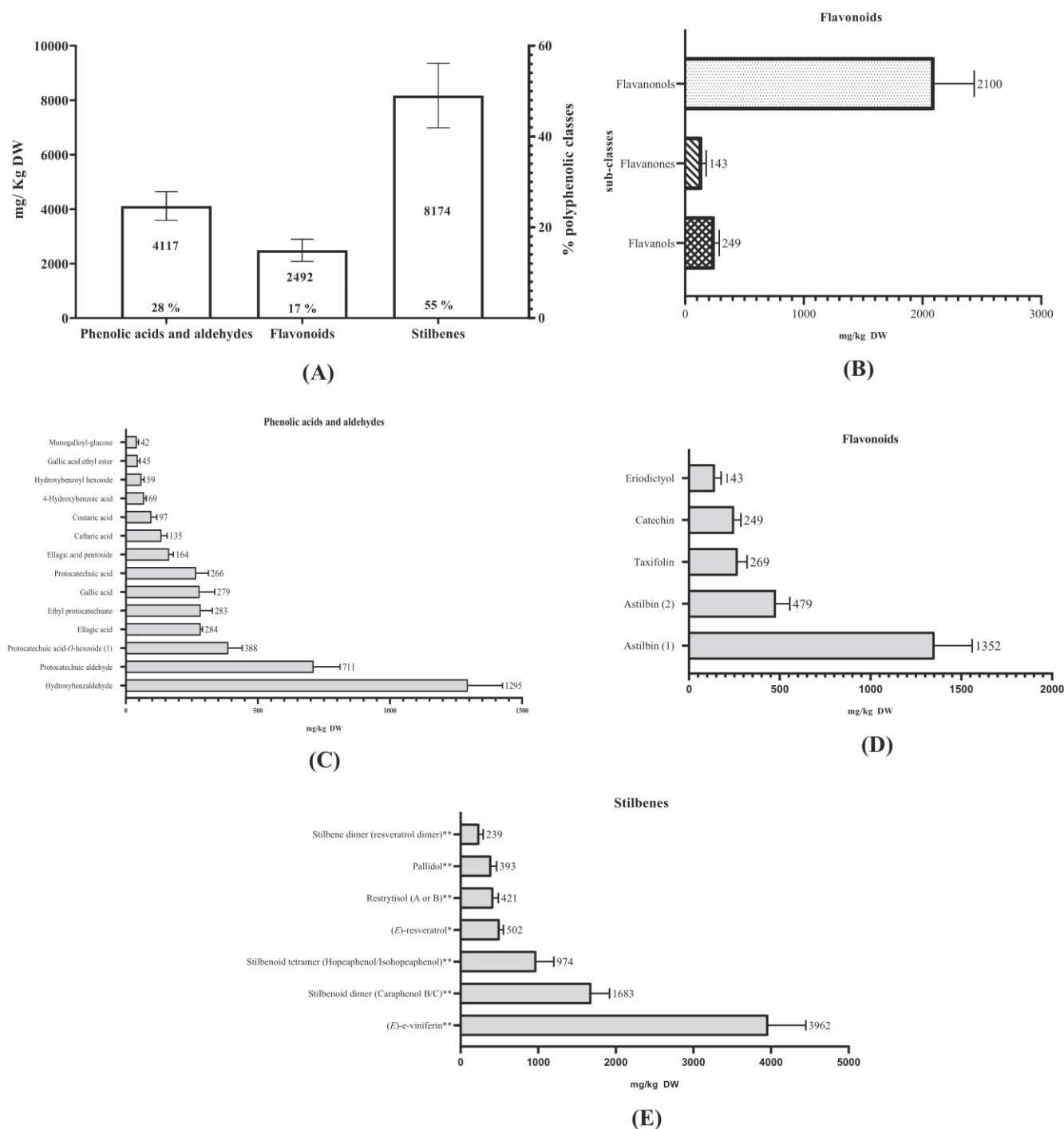


Fig. 3. Semi-quantification of phenolic compounds in a grape cane pilot-plant extract (expressed in mg/kg DW). (A) Concentration and percentage levels of each phenolic class in the extract. (B) Cumulative levels of flavonoid subclasses: flavanonols (expressed in equivalents of taxifolin), flavanones (expressed in equivalents of eriodictyol), and flavanols (expressed in equivalents of epicatechin). (C) Levels of individual phenolic acids and aldehydes (expressed in equivalents of gallic acid). (D) Levels of individual flavonoids. (E) Levels of individual stilbenes (expressed as: **(E)*-resveratrol equivalents and ***(E)*-ε-viniferin equivalents).

(45 ± 8 mg/kg DW). This metabolite is reported in plants, but as it can also be formed by gallic acid condensation with ethanol, its origin in the extract is difficult to establish.

Monogalloyl-glucose was found at low levels (42 ± 6 mg/kg DW), although its detection provided evidence for the presence of gallotannins in the grape cane pilot plant extract.

The concentration of protocatechuic acid (266 ± 47 mg/kg DW) was in accordance with the results reported for vine shoots of grape cultivars such as Tempranillo, Cabernet Franc, Malbec, and Mazuelo (Delgado-

Torre et al., 2012). This compound has very promising inhibitory properties against neurodegenerative diseases like Alzheimer's and Parkinson's (Krzysztoforska, Mirowska-Guzel, & Widy-Tyszkiewicz, 2019). The high level of ethyl protocatechuate (283 ± 45 mg/kg DW) is provisionally attributed to the condensation of protocatechuic acid with ethanol.

Two hydroxycinnamic acids, caftaric (135 ± 21 mg/kg DW) and coumaric (97 ± 20 mg/kg DW) acids, were semi-quantified at higher levels than a previous reported (77.60 and 19.39 mg/kg, respectively)

(Goufo et al., 2020). Caftaric acid has shown anti-oxidant and anti-inflammatory effects in indomethacin-induced gastric ulcers (Tanyeli et al., 2019).

The concentration of 4-hydroxybenzoic acid (69 ± 8 mg/kg DW) is similar to levels reported in Sauvignon Blanc vine-shoot extracts using superheated liquid extraction (Delgado-Torre et al., 2012). 4-hydroxybenzoic acid has recently emerged as a promising intermediate for diverse value-added bioproducts with potential biotechnological applications in food, pharmacy, cosmetics, and fungicides (Wang, Bilal, Hu, Wang, & Zhang, 2018). We also detected a low concentration of hydroxybenzoyl hexoside (59 ± 10 mg/kg DW).

3.2.2. Flavonoids

Flavonoids have a wide variety of cosmetic, nutraceutical, and pharmaceutical applications, due to their anti-inflammatory and antioxidative properties (Panche, Diwan, & Chandra, 2016).

The cumulative concentration of flavonoids recovered from the pilot plant grape cane extract was 2492 ± 408 mg/kg DW (Fig. 3A). The highest level was observed for flavanones (2100 ± 336 mg/kg DW), followed by flavanols (249 ± 38 mg/kg DW), and flavanones (143 ± 34 mg/kg DW) (Fig. 3B), while three flavonols were detected but not quantified.

Flavanols. High levels of two isomers of astilbin 1 (1352 ± 208 mg/kg DW) and astilbin 2 (479 ± 76 mg/kg DW) were observed (Fig. 3D). High levels of astilbin have been reported in Sauvignon grapes during noble rot stages, suggesting it is used by the plant to fight against botrytis (Landraut et al., 2002). Taxifolin was also detected in a significant concentration (269 ± 52 mg/kg DW), similar to a study using ohmic heating to extract bioactive compounds from Loureiro vine pruning residue collected in Minho-Portugal (Jesus et al., 2020). Taxifolin has shown a wide range of pharmacological properties, such as antimicrobial, antioxidant, anti-Alzheimer, hepatoprotective, and cardioprotective (Sunil & Xu, 2019), and is therefore of interest for the development of new natural drugs for the control of various illnesses.

Flavanols. Highly variable levels of the extensively studied catechin were recently reported in grape canes (65 to 6735 mg/kg) (Goufo et al., 2020). The concentration in our study (249 ± 38 mg/kg DW) (Fig. 3D) was similar to the results obtained with toasted vine-shoot chips of Airén and Cencibel varieties extracted at 180°C for 45 min (Cebrián-Tarancón et al., 2018b). Epicatechin and procyanidin A-type dimer were detected but not quantified ($<\text{LOQ}$). Procyanidin A-type dimer may be the result of thermal conversion from B-type procyanidin dimers, which seem sensitive to thermal-oxidative processes.

Flavanones. As well as the parent compound eriodictyol (143 ± 34 mg/kg DW), two glycosides, eriodictyol-*O*-glucoside isomers 2 and 1, were detected but not quantified ($<\text{LOQ}$). These compounds are not commonly found in grape canes, although they were also identified in our previous work (Escobar-Avello et al., 2019). Eriodictyol defends against oxidative stress and could have application in nutraceuticals for the prevention of cardiovascular disease (Lee et al., 2015).

Flavonols. Three flavonols: quercetin-3-*O*-glucuronide, quercetin-3-*O*-glucoside, and kaempferol-3-*O*-glucoside were also only detected but not quantified ($<\text{LOQ}$). Although predominant in grapevine leaves (Goufo et al., 2020), these flavonols are not usually reported in grape canes. Notwithstanding, all these compounds have been previously quantified in whole Bois Noir-infected and also healthy Chardonnay canes (Rusjan & Mikulic-Petkovsek, 2015). Glycosylated quercetin and kaempferol have potential as natural drugs because of their anti-influenza, anti-leishmania, and anti-inflammatory activities (Xiao, 2017).

3.2.3. Stilbenes

The most studied stilbene, resveratrol, is associated with activity against pathologies related to oxidative stress, inflammatory biomarkers, type 2 diabetes, and cardiovascular and neurological diseases (Ramírez-Garza et al., 2018).

Stilbenoids were the predominant polyphenol class detected in the grape cane extract (8174 ± 1185 mg/kg DW in total) (Fig. 3A). The most abundant was (*E*)- ϵ -viniferin (3962 ± 485 mg/kg DW) (Fig. 3E), its concentration almost 3-fold higher than in a previous study of a Pinot noir grape cane extract obtained using ultrasound under laboratory conditions (Sáez et al., 2018). A stilbenoid (resveratrol) dimer (239 ± 51 mg/kg DW) and pallidol (393 ± 71 mg/kg DW) were semi-quantified, the concentration of the latter falling within the range previously reported in grape canes (4 to 1276 mg/kg) (Goufo et al., 2020).

Three stilbenoid heterodimers (at *m/z* 469) were observed, the most abundant being heterodimer 1 (Caraphenol B/C) (1683 ± 236 mg/kg DW), while heterodimers 2 and 3 were only detected but not quantified ($<\text{LOQ}$). An isomer at *m/z* 469, namely ampelopsin A, has been previously quantified in grape canes (204–207 mg/kg) (Sáez, Gayoso, et al., 2018).

High levels of a stilbenoid tetramer (hopeaphenol/isohopeaphenol) (974 ± 227 mg/kg DW) were also found. Both hopeaphenol and isohopeaphenol have been detected in grapevine canes at higher concentrations (1439 and 3521 mg/kg, respectively) (Goufo et al., 2020), whereas a comparable level of hopeaphenol (1126 ± 294 mg/kg DW) was detected in woody canes of Pinot noir collected in France (Lambert et al., 2013).

The concentration of (*E*)-resveratrol (502 ± 50 mg/kg DW), although significant, was lower than the levels obtained by Vergara et al. (2012) (723 to 5590 mg/kg) in extracts obtained using ultrasound under laboratory conditions from eleven samples of Pinot noir collected in different locations of Southern Chile. The lower levels of resveratrol in our study could be due to oxidation, degradation, and epimerization reactions during the pilot plant extraction. The oxidation of resveratrol is simple and can be mediated by plant constituents such as peroxidases, exogenous fungal laccases, and also reactive oxygen species generated by UV irradiation (Keylor et al., 2015).

The oxidized dimer with the highest concentration was restrytol (A or B) (421 ± 65 mg/kg DW). Oxidized stilbenoid dimers have been previously identified in grape canes of the Pinot noir variety, one at notably high concentrations (up to 868 ± 14 mg/kg DW) (Sáez et al., 2018).

Finally, we also detected a low amount of oxyresveratrol, resveratrol C-glucoside, resveratrol dimer-*O*-hexoside, and an unidentified stilbenoid trimer. However, all of them were below the quantification limit ($<\text{LOQ}$).

3.3. Antioxidant capacity of grape cane pilot-plant extract

The antioxidant capacity of grape canes has been studied by several authors (Dorosh et al., 2020; Jesus et al., 2019; Karacabey & Mazza, 2010; Moreira et al., 2018) and through diverse methods of antioxidant capacity. High variability in the antioxidant activity has been found in the literature, which could be partially explained by grape canes variety, extractions conditions, or analytical protocols used in each study.

The antioxidant capacity of grape cane pilot-plant extract measured by the radical antioxidant scavenging potential (ABTS^{•+}), and by assay of oxygen radical absorbance capacity using fluorescein (ORAC-FL) were 2209 ± 125 $\mu\text{mol TE/g DW}$ and 4612 ± 155 $\mu\text{mol TE/g DW}$, respectively. Those concentrations were very similar to a previous study of a Pinot noir grape cane extraction at a bench-scale of 7L where the values found were 1954 ± 264 $\mu\text{mol TE/g}$ and 6895 ± 996 $\mu\text{mol TE/g}$, respectively and under the same extraction conditions (Riquelme et al., 2019).

4. Conclusion

Pilot-plant scale extraction of grape canes allowed the recovery of 44 phenolic compounds. Grape cane pilot-plant extract showed a high antioxidant capacity measured by ABTS^{•+} (2209 ± 125 $\mu\text{mol TE/g DW}$) and ORAC-FL (4612 ± 155 $\mu\text{mol TE/g DW}$). The most diverse classes

were phenolic acids and aldehydes (17), while the most predominant were the stilbenes (8174 ± 1185 mg/kg DW), (*E*)- ϵ -viniferin being the most abundant (3962 ± 485 mg/kg DW).

The phenolic composition of grape cane extracts is highly dependent on the extraction conditions. The phenolic profile obtained on a pilot scale showed some differences compared with a previous laboratory-scale extraction (Escobar-Avello et al., 2019). The most relevant differences were the minor presence of oligomeric procyanidins and prodelphinidins. Moreover, phenolic aldehydes were only present in pilot grape cane extract. These differences highlight the importance of carrying out a comprehensive characterization of phenolic profiles in the scale-up process before industrial exploitation. Their unique mixture of phenolic compounds makes grape cane pilot-plant extracts a promising by-product for the development of novel nutraceutical and pharmaceutical products.

CRedit authorship contribution statement

Danilo Escobar-Avello: Writing - original draft, Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Visualization. **Claudia Mardones:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing - review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Vania Saéz:** Conceptualization, Investigation, Writing - review & editing. **Sebastián Riquelme:** Methodology, Formal analysis. **Dietrich Baer:** Conceptualization, Investigation, Writing - review & editing. **Rosa M. Lamuela-Raventós:** Investigation, Resources, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition. **Anna Vallverdú-Queralt:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by the Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID)/PCI-REDES170051; ANID PIA/APOYO CTE AFB170007; CORFO 14 IDL2- 30156, from Chile; CYCIT [AGL2016-75329-R], CIBEROBN from the Instituto de Salud Carlos III, ISCIII from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, (AEI/FEDER, UE) and Generalitat de Catalunya (GC) [2017SGR 196]. Danilo Escobar-Avello is grateful to ANID/ Scholarship Program/ DOCTORADO BECAS CHILE/2017—72180476. Anna Vallverdú-Queralt thanks to the Ministry of Science, Innovation and Universities for the Ramon y Cajal contract (RYC-2016-19355). The authors would like to thank the CCiT-UB for the mass spectrometry equipment. We would also like to show our gratitude to Mr. José Fuentes and their staff for their technical assistance in the pilot extraction.

References

Baderschneider, B., & Winterhalter, P. (2000). Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from Riesling wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2681–2686. <https://doi.org/10.1021/jf991348k>.

Baderschneider, B., & Winterhalter, P. (2001). Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2788–2798. <https://doi.org/10.1021/jf010396d>.

Cebrián-Tarancon, C., Sánchez-Gómez, R., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., Mena-Morales, A., García-Romero, E., ... Zalacain, A. (2018). Vine-Shoot Tannins: Effect of Post-pruning Storage and Toasting Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(22), 5556–5562. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01540>.

Cebrián-Tarancon, C., Sánchez-Gómez, R., Salinas, M. R., Alonso, G. L., Oliva, J., & Zalacain, A. (2018). Toasted vine-shoot chips as enological additive. *Food Chemistry*, 263, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.105>.

Chen, L., Yuan, P., Chen, K., Jia, Q., & Li, Y. (2014). Oxidative conversion of B- to A-type procyanidin trimer: Evidence for quinone methide mechanism. *Food Chemistry*, 154, 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.018>.

Dávila, I., Gullón, B., Luis Alonso, J., Labidi, J., & Gullón, P. (2018). Vine shoots as new source for the manufacture of prebiotic oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 207, 34–133. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.065>.

Dávila, I., Gullón, P., Andrés, M. A., & Labidi, J. (2017). Coproduction of lignin and glucose from vine shoots by eco-friendly strategies: Toward the development of an integrated biorefinery. *Bioresource technology*, 244, 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.104>.

Delgado-Torre, M. P., Ferreira-Vera, C., Priego-Capote, F., Pérez-Juan, P. M., & Luque De Castro, M. D. (2012). Comparison of accelerated methods for the extraction of phenolic compounds from different vine-shoot cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3051–3060. <https://doi.org/10.1021/jf205078k>.

Díaz-Galindo, E. P., Nescic, A., Cabrera-Barjas, G., Mardones, C., Von Baer, D., Bautista-Baños, S., & García, O. D. (2020). Physical-chemical evaluation of active food packaging material based on thermoplastic starch loaded with grape cane extract. *Molecules*, 25(6). <https://doi.org/10.3390/molecules25061306>.

Dorosh, O., Moreira, M. M., Rodrigues, F., Peixoto, A. F., Freire, C., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2020). Vine-canes valorisation: Ultrasound-assisted extraction from lab to pilot scale. *Molecules*, 25(7). <https://doi.org/10.3390/molecules25071739>.

Escobar-Avello, D., Lozano-Castellón, J., Mardones, C., Pérez, A. J., Saéz, V., Riquelme, S., ... Vallverdú-Queralt, A. (2019). Phenolic profile of grape canes: Novel compounds identified by LC-ESI-LTQ-orbitrap-MS. *Molecules*, 24(20). <https://doi.org/10.3390/molecules24203763>.

Fan, F. Y., Shi, M., Nie, Y., Zhao, Y., Ye, J. H., & Liang, Y. R. (2016). Differential behaviors of tea catechins under thermal processing: Formation of non-enzymatic oligomers. *Food Chemistry*, 196, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.056>.

Flamini, R., & De Rosso, M. (2018). High-Resolution Mass Spectrometry and Biological Properties of Grapevine and Wine Stilbenoids. *Studies in Natural Products Chemistry*, 61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64183-0.00005-1>.

García, D. E., Delgado, N., Aranda, F. L., Toledo, M. A., Cabrera-Barjas, G., Sintjago, E. M., & Paczkowski, S. (2018). Synthesis of maleinated polyflavonoids and lignin as functional bio-based building-blocks. *Industrial Crops and Products*, 123, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.065>.

García, D. E., Gavino, J., Escobar, D., & Cancino, R. A. (2017). Maleinated polyflavonoids and lignin as functional additives for three kinds of thermoplastics. *Iranian Polymer Journal*, 26(4), 295–304. <https://doi.org/10.1007/s13726-017-0519-z>.

Gasperotti, M., Masuero, D., Vrhovsek, U., Guella, G., & Mattivi, F. (2010). Profiling and accurate quantification of Rubus ellagitannins and ellagic acid conjugates using direct uplc-q-tof hdmis and hplc-dad analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4602–4616. <https://doi.org/10.1021/jf904543w>.

Gorena, T., Saez, V., Mardones, C., Vergara, C., Winterhalter, P., & Von Baer, D. (2014). Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chemistry*, 155, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.073>.

Goufo, P., Singh, R. K., & Cortez, I. (2020). A Reference List of Phenolic Compounds (Including Stilbenes) in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Roots, Woods, Canes, Stems, and Leaves. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 9(5). 9–13. <https://doi.org/10.3390/antiox9050398>.

Heras, R. M. Las, Quifer-Rada, P., Andrés, A., & Lamuela-Raventós, R. (2016). Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Journal of Functional Foods*, 23, 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.048>.

Huang, H., Chen, G., Lu, Z., Zhang, J., & Guo, D. A. (2010). Identification of seven metabolites of oxyresveratrol in rat urine and bile using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 24(4), 426–432. <https://doi.org/10.1002/bmc.1309>.

Jesus, M. S., Ballesteros, L. F., Pereira, R. N., Genisheva, Z., Carvalho, A. C., Pereira-Wilson, C., ... Domingues, L. (2020). Ohmic heating polyphenolic extracts from vine pruning residue with enhanced biological activity. *Food Chemistry*, 316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126298>.

Jesus, M. S., Genisheva, Z., Romani, A., Pereira, R. N., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2019). Bioactive compounds recovery optimization from vine pruning residues using conventional heating and microwave-assisted extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 132(August 2018), 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.070>.

Karacabey, E., & Mazza, G. (2010). Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chemistry*, 119(1), 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.029>.

Keylor, M. H., Matsuura, B. S., & Stephenson, C. R. J. (2015). Chemistry and Biology of Resveratrol-Derived Natural Products. *Chemical Reviews*, 115, 8976–9027. <https://doi.org/10.1021/cr500689b>.

Kondo, K., Kurihara, M., Fukuhara, K., Tanaka, T., Suzuki, T., Miyata, N., & Toyoda, M. (2000). Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: Evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation. *Pergamon Tetrahedron Letters*, 41, 485–488.

Krzysztoforska, K., Mirowska-Guzel, D., & Widy-Tyszkiewicz, E. (2019). Pharmacological effects of procatechuic acid and its therapeutic potential in neurodegenerative diseases: Review on the basis of in vitro and in vivo studies in rodents and humans. *Nutritional Neuroscience*, 22(2), 72–82. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1354543>.

Lambert, C., Richard, T., Renouf, E., Bisson, J., Waffo-Tégou, P., Bordenave, L., ... Cluzet, S. (2013). Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(47), 11392–11399. <https://doi.org/10.1021/jf403716y>.

Landraut, N., Larronde, F., Delaunay, J., Castagnino, C., Vercauteren, J., Merillon, J., ... Teissedre, P. (2002). Levels of Stilbene Oligomers and Astilbin in French Varietal

- Wines and in Grapes during Noble Rot Development. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7), 2046–2052. <https://doi.org/10.1021/jf010794g>.
- Lee, S. E., Yang, H., Son, G. W., Park, H. R., Park, C., Jin, Y., & Park, Y. S. (2015). Eriodictyol Protects Endothelial Cells against Oxidative Stress-Induced Cell Death through Modulating ERK / Nrf2 / ARE-Dependent Heme Oxygenase-1 Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 14526–14539. <https://doi.org/10.3390/ijms160714526>.
- Li, S., Xiao, J., Chen, L., Hu, C., Chen, P., Xie, B., & Sun, Z. (2012). Identification of A-series oligomeric procyanidins from pericarp of Litchi chinensis by FT-ICR-MS and LC-MS. *Food Chemistry*, 135(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.039>.
- Luo, H.-F., Zhang, L.-P., & Hu, C.-Q. (2001). Five novel oligostilbenes from the roots of Caragana sinica. *Tetrahedron*, 57, 4849–4854. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00427-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00427-6).
- Luque-Rodríguez, J. M., Pérez-Juan, P., & Luque De Castro, M. D. (2006). Extraction of polyphenols from vine shoots of *Vitis vinifera* by superheated ethanol-water mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8775–8781. <https://doi.org/10.1021/jf061855j>.
- Montero, L., Sáez, V., von Baer, D., Cifuentes, A., & Herrero, M. (2018). Profiling of *Vitis vinifera* L. canes (poly)phenolic compounds using comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1536, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.013>.
- Moreira, M. M., Barroso, M. F., Porto, J. V., Ramalhosa, M. J., Švarc-Gajić, J., Estevinho, L., ... Delerue-Matos, C. (2018). Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds. *Science of the Total Environment*, 634, 831–842. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.035>.
- Moss, R., Mao, Q., Taylor, D., & Saucier, C. (2013). Investigation of monomeric and oligomeric wine stilbenoids in red wines by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27(16), 1815–1827. <https://doi.org/10.1002/rcm.6636>.
- OIV. (2020). State of the World Vitivinicultural Sector in 2019. <http://www.oiv.int/js/lib/pdfs/web/viewer.html?file=/public/medias/7298/oivstate-of-the-vitivinicultural-sector-in-2019.pdf>. Accessed 16 June, 2020.
- Osman, A. M., & Wong, K. K. Y. (2007). Laccase (EC 1.10.3.2) catalyses the conversion of procyanidin B-2 (epicatechin dimer) to type A-2. *Tetrahedron Letters*, 48, 1163–1167. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.12.075>.
- Ou, B., Chang, T., Huang, D., & Prior, R. L. (2013). Determination of Total Antioxidant Capacity by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using Fluorescein as the Fluorescence Probe: First Action 2012.23. *Journal of AOAC International*, 96(6). <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-175>.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
- Paredo, K., Reyes, H., Escobar, D., Vega-Lara, J., Berg, A., & Pereira, M. (2015). Acetylation of bleached Kraft pulp: Effect of xylan content on properties of acetylated compounds. *Carbohydrate Polymers*, 117, 1014–1020. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.004>.
- Piñeiro, Z., Marrufo-Curtido, A., Serrano, M. J., & Palma, M. (2016). Ultrasound-assisted extraction of stilbenes from grape canes. *Molecules*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/molecules21060784>.
- Püssa, T., Floren, J., Kuldkepp, P., & Raal, A. (2006). Survey of Grapevine *Vitis vinifera* Stem Polyphenols by Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7404–7488. <https://doi.org/10.1021/jf061155e>.
- Ramírez-Garza, S. L., Laveriano-Santos, E. P., Marhuenda-Muñoz, M., Stornio, C. E., Tresserra-Rimbau, A., Vallverdú-Queralt, A., & Lamuela-Raventós, R. M. (2018). Health effects of resveratrol: Results from human intervention trials. *Nutrients*, 10(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu10121892>.
- Riquelme, S., Sáez, V., Escobar, D., Vergara, C., Fuentealba, C., Bustamante, L., ... Mardones, C. (2019). Bench-scale extraction of stilbenoids and other phenolics from stored grape canes (*Vitis vinifera*): Optimization process, chemical characterization, and potential protection against oxidative damage. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 64(2), 4414–4420. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072019000204414>.
- Rivière, C., Pawlus, A. D., & Mérillon, J.-M. (2012). Natural stilbenoids: Distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports*, 29(11), 1317. <https://doi.org/10.1039/c2np20049j>.
- Regev-Shoshani, G., Shoseyov, O., Bilkis, I., & Kerem, Z. (2003). Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *The Biochemical Journal*, 374(Pt 1), 157–163. <https://doi.org/10.1042/BJ20030141>.
- Rusjan, D., & Mikulic-Petkovsek, M. (2015). Phenolic responses in 1-year-old canes of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay induced by grapevine yellows (Bois noir). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(1), 123–134. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12106>.
- Sáez, V., Gayoso, C., Riquelme, S., Pérez, J., Vergara, C., Mardones, C., & von Baer, D. (2018). C18 core-shell column with in-series absorbance and fluorescence detection for simultaneous monitoring of changes in stilbenoid and proanthocyanidin concentrations during grape cane storage. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1074–1075, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.12.028>.
- Sáez, V., Pastene, E., Vergara, C., Mardones, C., Hermosín-gutiérrez, I., Gómez-alonso, S., ... Baer, D. Von (2018). Oligostilbenoids in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir grape cane extract : Isolation, characterization, in vitro antioxidant capacity and anti-proliferative effect on cancer cells. *Food Chemistry*, 265, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.050>.
- Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G. L., Salinas, M. R., Sánchez-Gómez, Rosario, Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2014). Vine-Shoot Waste Aqueous Extracts for Re-use in Agriculture Obtained by Different Extraction Techniques: Phenolic, Volatile, and Mineral Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(45), 10861–10872. <https://doi.org/10.1021/jf503929v>.
- Sharma, K., Ko, E. Y., Assefa, A. D., Ha, S., Nile, S. H., Lee, E. T., & Park, S. W. (2015). Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(2), 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.10.005>.
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocchio, E., & Trombetta, D. (2017). Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: Occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1244–1262. <https://doi.org/10.1111/bph.13630>.
- Snyder, S. A., & Brill, Z. G. (2011). Structural Revision and Total Synthesis of Caraphenol B and C. *Organic Letters*, 13(20), 5524–5527. <https://doi.org/10.1021/ol2022406>.
- Sunil, C., & Xu, B. (2019). An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry*, 166, Article 112066. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112066>.
- Tanyeli, A., Nur, F., Akdemir, E., Eraslan, E., Güler, M. C., & Nacar, T. (2019). Anti-oxidant and anti-inflammatuar effectiveness of caftaric acid on gastric ulcer induced by indomethacin in rats. *General Physiology and Biophysics*, 38, 175–181. <https://doi.org/10.4149/gpb.2018035>.
- Tinikul, R., Chenprakhon, P., Maenpuen, S., & Chaiyen, P. (2018). Biotransformation of Plant-Derived Phenolic Acids. *Biotechnology Journal*, 13(6), 1–12. <https://doi.org/10.1002/biot.201700632>.
- Turgut, S. S., Feyissa, A. H., Baltacıoğlu, C., Küçüköner, E., & Karacabey, E. (2020). Extraction simulation of porous media by CFD: Recovery of trans-resveratrol from grape cane by pressurised low polarity water system. *Chemical Engineering and Processing*, 148(2020), 107779. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2019.107779>.
- Valanciene, E., Jonuskiene, I., Syropas, M., Augustiniene, E., Matulis, P., Simonavicius, A., & Malys, N. (2020). Advances and prospects of phenolic acids production, biorefinery and analysis. *Biomolecules*, 10(6), 1–41. <https://doi.org/10.3390/biom10060874>.
- Vallverdú-Queralt, A., Meudec, E., Eder, M., Lamuela-Raventós, R. M., Sommerer, N., & Cheynier, V. (2017). Targeted filtering reduces the complexity of UHPLC-Orbitrap-HRMS data to decipher polyphenol polymerization. *Food Chemistry*, 227, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.106>.
- Vergara, C., Von Baer, D., Mardones, C., Wilkens, A., Werneckinck, K., Damm, A., ... Winterhalter, P. (2012). Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 929–933. <https://doi.org/10.1021/jf204482c>.
- Waffo-Teguo, P., Lee, D., Cuendet, M., Mérillon, J.-M., Pezzuto, J. M., & Kinghorn, A. D. (2001). Two New Stilbene Dimer Glucosides from Grape (*Vitis vinifera*) Cell Cultures. *Journal of Natural Products*, 64, 136–138. <https://doi.org/10.1021/np000426r>.
- Wan, Y.-J., Guo, Q., Liu, D., Jiang, Y., Zeng, K.-W., & Tu, P.-F. (2019). Protocatechualdehyde reduces myocardial fibrosis by directly targeting conformational dynamics of collagen. *European Journal of Pharmacology*, 855, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.05.003>.
- Wang, S., Bilal, M., Hu, H., Wang, W., & Zhang, X. (2018). 4-Hydroxybenzoic acid—a versatile platform intermediate for value-added compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3561–3571. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8815-x>.
- Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 1874–1905. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1032400>.
- Xue, Y. Q., Di, J. M., Luo, Y., Cheng, K. J., Wei, X., & Shi, Z. (2014). Resveratrol oligomers for the prevention and treatment of cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/765832>.
- Yan, L., Yin, P., Ma, C., & Liu, Y. (2014). Method development and validation for pharmacokinetic and tissue distributions of ellagic acid using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Molecules*, 19(11), 18923–18935. <https://doi.org/10.3390/molecules191118923>.
- Zwingelstein, M., Draye, M., Besombes, J. L., Piot, C., & Chatel, G. (2020). Viticultural wood waste as a source of polyphenols of interest: Opportunities and perspectives through conventional and emerging extraction methods. *Waste Management*, 102, 782–794. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.11.034>.

3.3 CAPÍTULO 3: ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE UN EXTRACTO DE PLANTA PILOTO DE CAÑA DE UVA EN HIDROXIPROPIL BETA-CICLODEXTRINA Y MALTODEXTRINA MEDIANTE SECADO POR PULVERIZACIÓN

Artículo titulado: “Encapsulation of Phenolic Compounds from a Grape Cane Pilot-Plant Extract in Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrin and Maltodextrin by Spray Drying”

Autores: **Danilo Escobar-Avello**, Javier Avendaño-Godoy, Jorge Santos, Julián Lozano-Castellón, Claudia Mardones, Dietrich von Baer, Javiana Luengo, Rosa M. Lamuela-Raventós, Anna Vallverdú-Queralt y Carolina Gómez-Gaete.

Revista: *Antioxidants*. 2021; 10(7):1130.

DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox10071130>

RESUMEN:

Los sarmientos, principales subproductos de la industria vitivinícola, contienen compuestos fenólicos bioactivos de alto valor, cuya aplicación se encuentra limitada por su inestabilidad y escasa solubilidad en agua. La encapsulación en ciclodextrinas permite superar estos inconvenientes. En este trabajo, se encapsuló un extracto de sarmientos a escala de planta piloto (GC_{PPE}) en hidroxipropil beta-ciclodextrina (HP- β -CD) mediante una técnica de secado por atomización y se confirmó la formación del complejo de inclusión por microscopía y espectroscopía infrarroja. El perfil fenólico del complejo se analizó mediante LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS y además se determinó la eficiencia de encapsulación de los compuestos fenólicos. Se identificaron 42 compuestos entre estilbenos, flavonoides y ácidos fenólicos, y se detectó un complejo de (*epi*) catequina con β -CD, lo que confirmó la interacción entre polifenoles y ciclodextrina. La eficiencia de encapsulación para el extracto total fue $80.5 \pm 1.1\%$, con restrytol mostrando el valor más alto ($97.0 \pm 0.6\%$) y (*E*)-resveratrol ($32.7 \pm 2.8\%$) el valor más bajo. La capacidad antioxidante del complejo de inclusión, determinada por ORAC-FL, fue de $5300 \pm 472 \mu\text{mol TE/g DW}$, valor similar al obtenido para el extracto no encapsulado. Esta formulación podría usarse para mejorar la estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del GC_{PPE} en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas solubles en agua.



Article

Encapsulation of Phenolic Compounds from a Grape Cane Pilot-Plant Extract in Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrin and Maltodextrin by Spray Drying

Danilo Escobar-Avello ^{1,2}, Javier Avendaño-Godoy ³, Jorge Santos ^{4,5}, Julián Lozano-Castellón ^{1,6} , Claudia Mardones ⁷ , Dietrich von Baer ⁷, Javiana Luengo ³, Rosa M. Lamuela-Raventós ^{1,6} , Anna Vallverdú-Queralt ^{1,6,*} and Carolina Gómez-Gaete ^{2,3,*}

- ¹ Department of Nutrition, Food Science and Gastronomy XaRTA, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Institute of Nutrition and Food Safety (INSA-UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; daniescobar01@ub.edu (D.E.-A.); julian.lozano@ub.edu (J.L.-C.); lamuela@ub.edu (R.M.L.-R.)
- ² Unidad de Desarrollo Tecnológico, Universidad de Concepción, 4191996 Coronel, Chile
- ³ Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, 4191996 Concepción, Chile; jaavendano@udec.cl (J.A.-G.); jluengo@udec.cl (J.L.)
- ⁴ DEMad, Instituto Politécnico de Viseu, 3504-510 Viseu, Portugal; jsantosu@estgv.ipv.pt
- ⁵ LEPABE—Faculty of Engineering, University of Porto, 4200-465 Porto, Portugal
- ⁶ Consorcio CIBER, M.P. Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBn), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain
- ⁷ Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, 4070386 Concepción, Chile; cmardone@udec.cl (C.M.); dvonbaer@udec.cl (D.v.B.)
- * Correspondence: avallverdu@ub.edu (A.V.-Q.); cargomez@udec.cl (C.G.-G.); Tel.: +34-934020834 (A.V.-Q.); +56-41-2204226 (C.G.-G.)



Citation: Escobar-Avello, D.; Avendaño-Godoy, J.; Santos, J.; Lozano-Castellón, J.; Mardones, C.; von Baer, D.; Luengo, J.; Lamuela-Raventós, R.M.; Vallverdú-Queralt, A.; Gómez-Gaete, C. Encapsulation of Phenolic Compounds from a Grape Cane Pilot-Plant Extract in Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrin and Maltodextrin by Spray Drying. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1130. <https://doi.org/10.3390/antiox10071130>

Academic Editors: Li Liang, Hao Cheng and Daniel Franco Ruiz

Received: 10 June 2021
Accepted: 13 July 2021
Published: 15 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Grape canes, the main byproducts of the viticulture industry, contain high-value bioactive phenolic compounds, whose application is limited by their instability and poorly solubility in water. Encapsulation in cyclodextrins allows these drawbacks to be overcome. In this work, a grape cane pilot-plant extract (GC_{PPE}) was encapsulated in hydroxypropyl beta-cyclodextrin (HP- β -CD) by a spray-drying technique and the formation of an inclusion complex was confirmed by microscopy and infrared spectroscopy. The phenolic profile of the complex was analyzed by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS and the encapsulation efficiency of the phenolic compounds was determined. A total of 42 compounds were identified, including stilbenes, flavonoids, and phenolic acids, and a complex of (*epi*)catechin with β -CD was detected, confirming the interaction between polyphenols and cyclodextrin. The encapsulation efficiency for the total extract was $80.5 \pm 1.1\%$, with resveratrol showing the highest value ($97.0 \pm 0.6\%$) and (*E*)-resveratrol ($32.7 \pm 2.8\%$) the lowest value. The antioxidant capacity of the inclusion complex, determined by ORAC-FL, was $5300 \pm 472 \mu\text{mol TE/g DW}$, which was similar to the value obtained for the unencapsulated extract. This formulation might be used to improve the stability, solubility, and bioavailability of phenolic compounds of the GC_{PPE} for water-soluble food and pharmaceutical applications.

Keywords: microencapsulation; cyclodextrin; vine shoots; food waste; *Vitis vinifera* L.; polyphenols; stilbenoids; mass spectrometry; Fourier Transform Infrared Spectroscopy; Scanning Electron Microscopy

1. Introduction

The generation of food and agricultural waste is a growing problem, with negative impacts on the economy, environment, and human health. Therefore, the integral valorization of these wastes by conversion into bioenergy or recovery of chemical compounds for biobased products is a technological challenge for achieving a circular economy. Alternative ways of disposing of food waste include the valorization of byproducts as a source of phenolic compounds used to fortify high-consumption foods or to formulate new functional foods [1].

Grape canes of *V. vinifera* L. produced during pruning are the main byproduct of viticulture, and millions of tons are generated worldwide every year [2,3]. With the aim of developing a circular economy by an integrated biorefinery strategy, grape canes are being investigated as a high-value resource due to their attractive chemical composition and potential industrial applications. These include SO₂ substitution in wine to improve wine quality [4], usage as a cosmetic ingredient [5] and as a filler in food packaging [4,6], and for the recovery of hemicellulosic oligosaccharides, lignin, and cellulosic substrates [7]. Above all, however, grape canes have been studied for their nutraceutical applications, as they contain high-added-value phenolic compounds with wide-ranging biological properties.

Grape canes contain a complex mixture of phenolic compounds, including phenolic acids (hydroxybenzoic acid and hydroxycinnamic acids), flavonoids (mainly proanthocyanidins, flavonols, flavanone and flavanones), and stilbenes (monomers, dimers, and oligomers). The most abundant phenolic compounds are proanthocyanidins and stilbene oligomers [8,9]. The phenolic composition of *V. vinifera* plants is genetically determined and strongly influenced by environmental conditions such as water stress [10]. Other determining factors, which particularly affect the stilbenes content, are the cultivar [11], the geographic region of cultivation [12], and the time, temperature, and humidity of storage after pruning [13]. Moreover, the yields of phenolic compounds such as resveratrol and ϵ -viniferin are highly dependent on variables of the extraction methods such as grape cane particle size, the type of solvent, temperature, duration, and the effects of light [14]. Furthermore, the phenolic profile of grape canes can also be altered by the extraction and scale-up process, where oxidation, degradation, or polymerization of proanthocyanidins have been observed, as well as the formation of phenolic aldehydes [2]. Phenolic compounds are known to be unstable and sensitive to high temperature, light, pH, and oxidative and degradative enzymes, which affects the phenolic profile of extracts. It is therefore important to find a strategy to protect phenolic compounds, and preserve their biological activities and properties. Enhancing their bioaccessibility and bioavailability and promoting their transport for absorption by the human body are also of great interest. Accordingly, new approaches, such as encapsulation with cyclodextrins, have been developed to overcome these drawbacks. [15].

Cyclodextrins are highly biocompatible and have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) as safe for humans. Several research studies have described the complexation of phenolic compounds with cyclodextrins [15], which provides protection from environmental conditions and improves bioactive shelf-life. Cyclodextrins, which have a truncated cone-shaped structure, possess a hydrophobic interior and a hydrophilic outer surface. Complexation in cyclodextrins improves the water solubility of phenolic compounds, which is otherwise relatively poor. The stability of the complex is maintained via hydrophobic forces, van der Waals interactions and hydrogen bonding [15]. Therefore, encapsulation of the bioactive molecule by cyclodextrin alters the physicochemical properties of both agents. Nevertheless, the effect of cyclodextrins on the profile of phenolic compounds from grape canes after encapsulation needs further study.

In this context, we encapsulated a previously characterized grape cane pilot-plant extract [2] in HP- β -CD by a spray-drying technique, using maltodextrin (MD) as a coating material. The physicochemical properties and parameters of the encapsulation process were determined, and the complex formation was verified by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy with diamond attenuated total reflectance (FTIR-ATR). In addition, the phenolic profile of the inclusion complex was investigated using LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS, and encapsulation efficiency and antioxidant capacity were determined. The microencapsulated extract is envisaged as a functional ingredient of food, cosmetics, biomaterials, and other biobased products.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

Gallic, 4-hydroxybenzoic, and ellagic acids, catechin, epicatechin, (*E*)-resveratrol, (*E*)- ϵ -viniferin, (*E*)-piceatannol, eriodictyol, taxifolin, quercetin, quercetin-3-*O*-glucoside, and quercetin-3-*O*-glucuronide were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Gallic acid and kaempferol-3-*O*-glucoside were acquired from Extrasynthèse (Genay, Auvergne-Rhône-Alpes, France). Isohopeaphenol and hopeaphenol were kindly given by the research group of Prof. Dr. Peter Winterhalter (Institute of Food Chemistry, Technical University Braunschweig, Lower Saxony, Germany). Light exposure was avoided when manipulating the standards.

HPLC-grade acetonitrile, formic acid, ethanol, and water were purchased from Merck (Darmstadt, Hesse, Germany). Ultrapure water was generated by a Milli-Q water purification system Millipore (Bedford, Massachusetts, USA). Potable ethanol (96%) from molasses employed for pilot-plant scale extraction was purchased from Oxiquim S.A. (Coronel, Concepción, Chile).

Hydroxypropyl beta-cyclodextrin (HP- β -CD, Kleptose[®], HP oral grade) was purchased from Roquette Frères (Lestrem, Lillers, France). Maltodextrin (MD) (dextrose equivalent 16.5–19.5) was obtained from Merck KGaA, (Darmstadt, Hesse, Germany).

2.2. Pilot-Plant Scale Extraction

Grape cane extraction was performed on a pilot-plant scale (750 L) at 80 °C for 100 min, following our previously reported extraction process [2].

After winter pruning, we collected a total of 500 kg of wet sample grape canes (*V. vinifera* L. cv. Pinot noir) from plants in an organic vineyard at Viña De Neira, located in Ránquil, Itata Valley, Biobio Region, Chile. All samples were cut into 30–50 cm long pieces and stored for three months at room temperature (19 °C $\pm$ 5) and 30–70% relative humidity, according to previous reports by Riquelme et al. [16] and Patent [13]. We used 67 kg of dry grape canes from a total sample of 500 kg of wet samples for the pilot-plant extraction, before which grape canes were crushed in a Retsch grinder (model SM) at 300–2000 rpm until particle size was less than 1 cm. After extraction, the ethanol used as a solvent for the extraction was removed and recovered by distillation (absolute pressure 0.05 bar). The liquid extract was collected in a dark container and protected from light.

2.3. Preparation of Microcapsules by Spray-Drying

The GC_{PPE} was in a mixed ethanol/water solution (30:70 *v/v*). HP- β -CD was used to prepare the microcapsules in a proportion of 2.2% *w/v* with the extract. MD in a proportion of 10% *w/v* was used as the coating material. HP- β -CD was slowly added to a beaker containing 200 mL of GC_{PPE} to avoid its agglomeration. The mixture was continuously stirred at room temperature and protected from the light for 24 h, during which the encapsulation took place. Then, MD was added slowly, and the mixture was stirred for a few minutes [17]. The microencapsulated and unencapsulated GC_{PPE} were dried using a Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Büchi, Flawil, Switzerland). Inlet temperature was maintained at 130 °C, while the outlet air temperature was 71 °C. Air inlet and airflow were 35–40 m³/h and 473 L/h, respectively. The spray dryer was equipped with a nozzle tip diameter of 0.7 mm and a peristaltic pump operated at 6–7 mL/min. The dried powder was collected and stored in an amber airtight container at 4 °C until analysis.

2.4. Determination of the Physical Properties of the Microencapsulated Powders

2.4.1. Moisture Content and Total Solids

The moisture content of the samples was calculated from the weight loss after heating the sample to 105 °C for 6 h [18].

2.4.2. Process Yield (PY%)

The yield of the powder process was calculated considering the number of solids introduced into the spray drying system and the powder obtained at the end of the technological process [19]. The results were determined according to Equation (1):

$$PY (\%) = \frac{\text{Powder after spray dry}}{\text{Solids introduced in the feeding}} \times 100 \quad (1)$$

2.4.3. Bulk Density

To determine the bulk density, about 10 g of the spray-dried sample was weighed, placed in a 25 mL graduated test tube, and the occupied volume was recorded [18].

2.4.4. Angle of Repose

The angle of repose was determined using a fixed funnel by the following Equation (2) as in Dadi et al. [18]:

$$\text{Angle of repose } (^{\circ}) = \tan^{-1} (H/R) \quad (2)$$

where H is the height of the pile and R is its radius at the base.

2.4.5. Size Distribution

The particle size distribution was determined in a particle size analyzer by laser diffraction with a Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Samples were dispersed in MilliQ water (900 mL) under constant stirring (2300 RPM) using a Hydro EV dispersion unit to achieve a homogeneous suspension. The particle size distribution in the powder (*span*) was calculated using Equation (3):

$$Span = (d_{90} - d_{10}) / d_{50} \quad (3)$$

where d_{90} , d_{10} , and d_{50} are the equivalent volume diameters at 90%, 10%, and 50% cumulative volume, respectively [20].

2.5. Scanning Electron Microscopy

The microcapsules and GC_{PPE} were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) using the JSM 6380 LV system (JEOL Techniques Ltd., Tokyo, Japan). The microscope was operated at 20 kV accelerating voltage. The samples were coated with a gold layer of about 150 Å in thickness, using an Edwards S 150 sputter coater (Agar Scientific, Standsted, UK) [21].

2.6. Fourier Transform Infrared Analysis

The FTIR absorption spectra of the individual samples of GC_{PPE}, HP-β-CD, the inclusion complex (IC) (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD), and the physical mixture were analyzed separately. The physical mixture (PM) (GC_{PPE}/HP-β-CD/MD) was prepared by accurately weighing HP-β-CD (100 mg), GC_{PPE} (100 mg), and MD (20 mg), which were ground in a mortar until the mixture was homogeneous. The resulting physical mixture was immediately analyzed by FTIR-ATR.

The FTIR spectra were recorded using a Bruker Alpha T FTIR (Bruker, Germany) spectrophotometer equipped with a diamond attenuated total reflectance (ATR) unit. The 32 scans were acquired over a spectral range of 4000–500 cm^{−1} with a resolution of 4 cm^{−1} [22,23]. All spectra were acquired and processed using the OPUS 7.0 software.

2.7. LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS Analyses

Liquid chromatography (LC) analysis was conducted using an Accela chromatograph (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with a quaternary pump, photodiode array detector, and thermostated autosampler. Chromatographic separation was performed in an Atlantis T3 column 2.1 × 100 mm, 3μm (Waters, Milford, MA, USA). Gradient elution

of analytes was performed utilizing H₂O/0.1% HCOOH (solvent A) and CH₃CN (solvent B) at a continuous flow rate of 0.350 mL/min, and an injection volume of 5 µL. The following gradient was applied: 0 min, 2% B; 0–2 min, 8% B; 2–12 min, 20% B; 12–13 min, 30% B; 13–14 min, 100% B; 14–17 min, 100% B; 17–18 min, 2% B and the column was equilibrated to the initial conditions for 5 min [24].

The LC equipment was coupled to an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) employed for accurate mass measurements and equipped with an electrospray ionization (ESI) source operating in negative mode. The working parameters were as follows: source voltage, 4 kV; sheath gas, 20 a.u. (arbitrary units); auxiliary gas, 10 a.u.; sweep gas, 2 a.u.; and capillary temperature, 275 °C. Default values were used for most of the other acquisition parameters (FT Automatic gain control target $5 \cdot 10^5$ for MS mode and $5 \cdot 10^4$ for MSⁿ mode). Samples were analyzed in FTMS mode with a resolving power of 30,000 (FWHM at m/z 400) and data-dependent MS/MS events were acquired with a resolving power of 15,000. The most intense ions detected in the FTMS spectrum were chosen for the data-dependent scan. The parent ions were fragmented by high-energy C-trap dissociation by normalized collision energy of 35 V and an activation time of 10 ms. The mass range in FTMS mode was from m/z 100 to 1500. Instrument control and data recovery were conducted using Xcalibur 3.0 software (Thermo Fisher Scientific). The tentative identification of analytes was performed by comparing MS/MS spectra with fragments found in databases and the literature when no standard compound was available [25].

Individual compounds were semi-quantified using pure standards or the most similar compounds. Some analytes, such as glycosylated forms, dimers, or oligomers, were semi-quantified using the aglycone form of the monomer [2].

2.8. Encapsulation Efficiency

Encapsulation efficiency was calculated by considering the nonencapsulated compounds present in the GC_{PPE} before the encapsulation process and the encapsulated compounds after the spray drying process. The identification and quantification of phenolic compounds from GC_{PPE} were specified in a previous article [2] (see detail Supplementary Materials Table S1). Extraction of polyphenols from the microcapsules was performed according to the procedure of Robert et al. [26] with minor modifications. Before the analysis, samples were dissolved in highly pure deionized water containing 0.1% *v/v* formic acid (1 mg/mL). The GC_{PPE} was centrifuged at 4000 rpm for 5 min at 4 °C. The supernatant was recovered, and the extraction procedure was repeated twice. The supernatants were combined and evaporated under nitrogen flow, and the residue was reconstituted in 0.1% aqueous formic acid (5 mL). The samples were filtered through 0.20 µm PTFE membrane filters (Waters Corporation, Milford, CT, USA) into an amber vial. Subsequently, both samples were analyzed using LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS to determine the individual degree of encapsulation according to the method described above (Section 2.7). We estimated the encapsulation efficiency (EE), according to Radünz et al. [27], based on Equation (4):

$$EE (\%) = \frac{\text{Phenolic compound of GCPPE} - \text{Phenolic compound of the capsule}}{\text{Phenolic compound of GCPPE}} \times 100 \quad (4)$$

2.9. Antioxidant Capacity Assay

The assay of oxygen radical absorbance capacity using fluorescein (ORAC-FL) was carried out according to the method reported by Ou et al. [28]. The calibration curves were prepared with Trolox, and results reported as µmol Trolox equivalents (TE) by grams of dried weight (DW) (TE/g DW). All assays were performed in triplicate and protected from light.

2.10. Statistical Analysis

All samples were run at least three times, and results are expressed as means ± standard deviations. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant using Student's

t-test with 95% confidence. Statistical analyses were determined using GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Physical Characterization of the Microencapsulated Powder

Table 1 shows the physicochemical properties and process parameters for the GC_{PPE} and inclusion complex (IC) (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD). The process yield obtained by spray-drying for IC (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD) was 83.8 ± 2.6%, which was two-fold higher than for GC_{PPE} alone (38.4 ± 1.2%). Similarly, the total solids increased 2.6-fold for the microencapsulated formulation. The high yield of powdered microparticles can be attributed to the rapid formation of the drying crust, which prevents the powder from adhering to the drying chamber [29]. Our result constitutes an improvement on the yield (64.5 ± 1.5%) reported by Davidov-Pardo et al. [30], who microencapsulated a grape seed extract using MD. The high values obtained in our work are promising for the development of industrial-scale applications.

Table 1. Physical characteristics and process parameters for the grape cane phenolic extract (GC_{PPE}) and inclusion complex (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD).

	Process Parameters			Size Distribution		Property of Powders	
	Moisture (%)	Solids (g)	PY (%)	D50 (μm)	Span	Bulk Density (g/mL)	Angle of Repose(°)
GC _{PPE}	6.3 ± 1.5 ^a	11.0 ± 0.1 ^a	38.4 ± 1.2 ^a	17.5 ± 0.4 ^a	6.15 ± 0.1 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	34.8 ± 0.5 ^a
IC (GC _{PPE} +HP-β-CD+MD)	7.2 ± 0.3 ^a	28.9 ± 0.1 ^b	83.8 ± 2.6 ^b	10.9 ± 0.9 ^b	6.14 ± 0.1 ^a	0.19 ± 0.01 ^b	36.9 ± 1.3 ^a

Results are expressed as means ± standard deviations, and values with different superscripts letters in a column indicate significant differences at *p* < 0.05.

The particle size distribution and median particle diameter were smaller in the IC (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD) than in the GC_{PPE} alone; the particle sizes were 10.9 μm and 17.5 μm, respectively. According to the literature, the diameter of spray-dried particles depends on the properties of the material, the drying conditions, the atomization method used, and the concentration and viscosity of the encapsulated material [31]. The *span* values of the IC (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD) and GC_{PPE} were very similar, 6.14 and 6.15, respectively, and were higher than those reported for an aqueous grape skin extract microencapsulated with Arabic gum, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum, which ranged from 1.91 to 5.99 [32]. A lower *span* value is a desirable result, as it indicates a more homogeneous particle size distribution [32].

The bulk density was 0.10 ± 0.01 g/mL and 0.19 ± 0.01 g/mL for the GC_{PPE} and IC (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD), respectively, being lower than the values reported for encapsulated rosemary essential oil (0.25–0.34 g/mL) [31] or soy milk (0.21–0.22 g/mL) [20]. The slightly higher bulk density of the IC (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD) vs. the GC_{PPE} indicates an improved powder flow, as a more densely packed powder reflects weaker forces between the particles [20]. Density is an important factor for the packaging, transportation, and marketing of a microencapsulated product. A dry product with high density can be stored in a smaller container compared to a less dense product [31]. The flowability of the samples was also determined by the angle of repose, which was 34.8° ± 0.5 for the GC_{PPE} and 36.9° ± 1.3 for the IC (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD), showing no statistical difference between them. A similar value was obtained in a study on the microencapsulation of bioactive products from a *Moringa stenopetala* leaf extract using MD, where the angle of repose was 37.26° ± 1.01 [18].

3.2. Surface Morphology: SEM Analysis

SEM can be used to determine the surface morphology of materials and is recognized as an auxiliary method for monitoring the formation of inclusion complexes. The structure and size of the GC_{PPE} and IC (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD) in the solid state obtained from the

spray-drying process were analyzed through microscopy. Microcapsules should preferably have a slightly spherical form and a uniform and smooth cover with minimum fractures and signs of collapse [33]. The SEM micrographs showed that the GC_{PPE} was composed of a mixture of non-spherical particles with irregular surfaces and other larger spherical microparticles (Figure 1A–C). In contrast, the IC (GC_{PPE}+HP- β -CD+MD) was spherical, and without visible pores on a smooth surface; microparticles of a variable size but with similar morphology were observed together (Figure 1D–F). These significant morphological changes are probably due to a loss of crystallinity of the guest molecule after its inclusion in the cyclodextrin [34]. The SEM results provided evidence for the formation of the IC (GC_{PPE}+HP- β -CD+MD), which was subsequently supported by mass spectrometry and FTIR analysis.

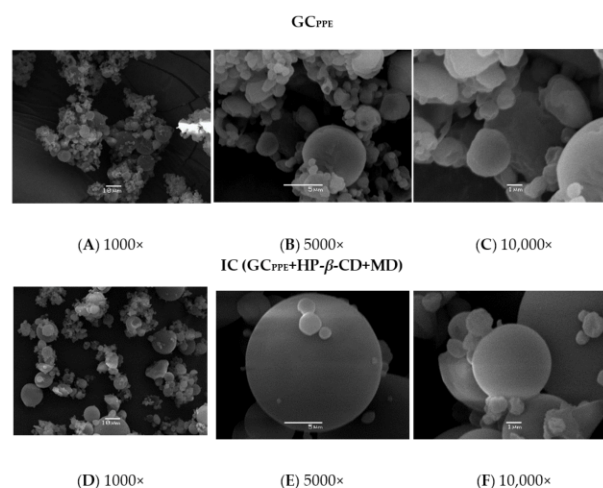


Figure 1. Scanning electron microscopy micrographs of the GC_{PPE} (A–C) and IC (GC_{PPE}+HP- β -CD+MD) (D–F) at different magnifications.

3.3. FTIR Analysis of Spray-Dried Powders

FTIR-ATR is a useful method to detect the formation of inclusion complexes, which are revealed by changes in the FTIR spectra, such as the reduction, disappearance, or shift of absorption bands, due to weak intermolecular interactions [35]. The FTIR spectra of the GC_{PPE}, HP- β -CD, IC (GC_{PPE}+HP- β -CD+MD), and physical mixture (PM) (GC_{PPE}/HP- β -CD/MD) are shown in Figure 2.

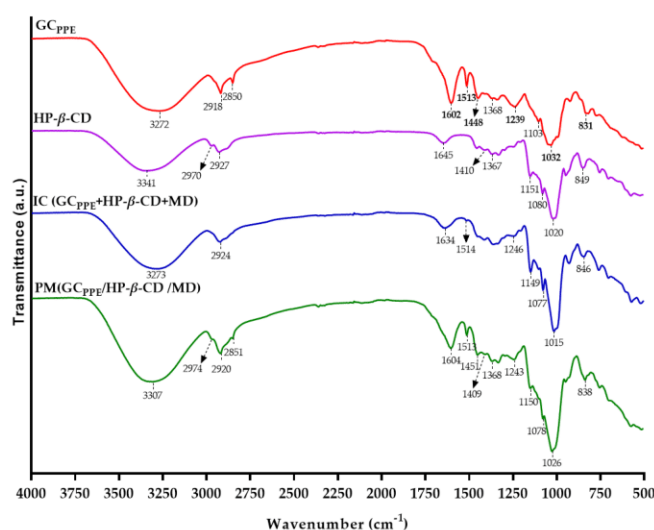


Figure 2. FTIR-ATR spectra of the GC_{PPE} (red), HP- β -CD (purple), IC (GC_{PPE}+HP- β -CD+MD) (blue), and PM (GC_{PPE}/HP- β -CD/MD) (green).

The FTIR spectrum of the GC_{PPE} (Figure 2, red) showed specific bands associated with phenolic compounds (in bold). The peaks at 1602 cm⁻¹ and 1448 cm⁻¹ were owing to the C=C stretching vibration of the phenolic aromatic ring and the C-H bending vibrations of the CH₂ groups. The peak at 1239 cm⁻¹ was assigned to C=O stretching of gallic or ellagic acid components due to the presence of hydrolyzable tannins [36]. The band at 1513 cm⁻¹ was due to the C-C benzene skeletal vibrations of stilbenoids. The strong band at 1032 cm⁻¹ is attributed to C-O stretching in phenolic compounds [22]. Moreover, the band at 831 cm⁻¹ was due to the C-H out-of-plane bending vibrations of aromatic compounds. On the other hand, the signals at 2918 cm⁻¹ and 2850 cm⁻¹ were related to the CH₂ asymmetric and symmetric stretch vibration in aliphatic hydrocarbons [37]. Additionally, a peak at 1103 cm⁻¹ was observed owing to the C-H in-plane bending vibration [36].

The FTIR spectrum of HP-β-CD (Figure 2, purple) showed bands at 3341 cm⁻¹ due to O-H stretching vibrations and 2927 cm⁻¹ due to C-H stretching vibrations. The peaks at 1645 cm⁻¹ correspond to the bending of H-O-H, at 1151 cm⁻¹ to C-O vibration, and at 1020 cm⁻¹ to the C-O-C symmetric stretching vibration. The peak at 849 cm⁻¹ was due to an α-type glycosidic bond [38]. The band at 1080 cm⁻¹ was ascribed to C-C stretching vibrations, and the peak at 1410 cm⁻¹ to C-C-H and O-C-H bending [39]. The presence of the hydroxypropyl group was recognized by a peak at 2970 cm⁻¹ corresponding to the antisymmetric vibration of methyl groups. Additionally, a peak was observed at 1367 cm⁻¹, which was ascribed to the bending vibration of the methyl group [40].

The spectrum of the IC (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD) (Figure 2, blue) shows that some of the characteristic peaks of the GC_{PPE} and HP-β-CD have shifted, decreased, or disappeared. The bands at 1645 cm⁻¹ and 1020 cm⁻¹ of HP-β-CD have shifted to 1634 cm⁻¹ and 1015 cm⁻¹, respectively, in the IC. Two peaks of the GC_{PPE} at 1239 cm⁻¹ and 1513 cm⁻¹, ascribed to the presence of hydrolysable tannins and stilbenes, respectively, have shifted to 1246 cm⁻¹ and 1514 cm⁻¹, showing a sharp reduction in intensity due to the complexation, whereas the peak at 2850 cm⁻¹ disappeared. Furthermore, the bands of the GC_{PPE} at 1602 cm⁻¹ and 1448 cm⁻¹, related to the phenolic aromatic ring, completely disappeared in the IC (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD). These findings may indicate that the phenolic rings became embedded in the HP-β-CD cavities.

The FTIR spectrum of the PM (Figure 2, green) showed a simple overlap between the individual components of GC_{PPE}, HP-β-CD, and MD. Insignificant variations in intensity were detected, indicating a mixture of the three components without interactions between them.

3.4. Phenolic Profile of the IC (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD) by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS

We performed a targeted analysis of phenolic compounds in the IC (GC_{PPE}+HP-β-CD+MD) using LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. Table 2 shows 42 identified compounds with their accurate mass, theoretical mass, retention times (min), molecular formula, error (ppm) between the found mass and the accurate mass of each compound, and the MS/MS fragment ions with their respective intensities used for identification. The identification was further supported by comparisons with mass spectra databases and the literature. In addition, 13 phenolic compounds were identified by comparing the retention times and their masses with pure standards. We have reported the fragmentation patterns of most of these compounds in previous studies using an analytical [8] and pilot-scale extraction [2].

Table 2. Identification of phenolic compounds in the IC (GC_{PTE}+HP- β -CD+MD), an adduct of β -CD and a complex between β -CD with (*epi*)catechin using LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS in negative mode.

Compounds	t _R (min)	Accurate Mass [M – H] [–]	Theo. Mass	Error (ppm)	MS/MS Ions (Intensity)	Molecular Formula
Gallic acid *	4.33	169.0138	169.0142	–2.41	125.0236(100)	C ₇ H ₆ O ₅
Monogalloyl-glucose [β -CD+HCOO] [–]	5.79	331.0662	331.0671	–2.65	169.0134(100), 125.0238(5)	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀
Protocatechuic acid-O-hexoside (1)	7.21	1179.3679	1179.3680	–0.04	675.8472(100), 797.1872(80), 332.8267(80), 734.6646(80)	C ₄₃ H ₇₂ O ₃₇
Protocatechuic acid	7.35	315.0718	315.0722	–1.07	153.0186(100), 109.0288(10)	C ₁₃ H ₁₆ O ₉
Protocatechuic acid-O-hexoside (2)	7.55	153.0190	153.0193	–2.16	109.0288(100)	C ₇ H ₆ O ₄
Syringic acid hexoside	8.46	315.0717	315.0722	–1.30	153.0189(100), 109.0290(10)	C ₁₃ H ₁₆ O ₉
Protocatechuic aldehyde	8.66	359.0933	359.0925	2.21	197.0445(100)	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀
Procyanidin dimer (1)	9.32	137.0241	137.0244	–2.02	93.0338(100), 109.0285(70)	C ₇ H ₆ O ₃
Procyanidin dimer (2)	10.34	577.1348	577.1351	–0.69	425.0864(100), 407.0760(70), 451.1019(45), 289.0706(35)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
Catechin *	10.77	577.1346	577.1351	–0.35	425.0861(100), 407.0757(60), 451.1017(35), 289.0705(25)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
Complex [β -CD+(<i>epi</i>)catechin] [–]	11.29	289.0722	289.0718	1.43	245.0817(100), 205.0504(40), 179.0348(20)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Epicatechin *	13.00	1423.5708	1423.5718	–0.71	1245.4839(100), 1303.5255(85), 1101.4424(60), 1365.5260(60), 1.083.4313(60)	C ₅₇ H ₈₄ O ₄₁
Restrytol (A or B)	13.29	289.0715	289.0718	–1.00	245.0812(100), 205.0499(40), 179.0343(15)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Epicatechin gallate *	15.08	471.1441	471.1449	–1.86	255.0653(100), 377.1017(65), 349.1068(45)	C ₂₈ H ₂₄ O ₇
Taxifolin *	16.86	441.0821	441.0827	–1.30	289.0705(100), 169.0136(30)	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀
Astilbin (1)	17.00	303.0508	303.0510	–0.78	285.0397(100), 177.0186(15), 125.0238(10)	C ₁₅ H ₁₂ O ₇
Taxifolin isomer	17.36	449.1084	449.1089	–1.12	303.0495(100), 285.0392(85), 151.0028(30)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁
Stilbenoid heterodimer (caraphenol B/C)	17.43	303.0503	303.0510	–2.32	285.0390(100), 177.0184(15), 125.0237(10)	C ₁₅ H ₁₂ O ₇
(<i>E</i>)-Piceatannol *	17.78	469.1292	469.1293	–0.06	451.1189(100), 363.0875(35), 375.0872(30), 281.0452(2)	C ₂₈ H ₂₂ O ₇
Kaempferol-3-O-glucoside *	17.95	243.0665	243.0663	0.79	225.0551(100), 201.0552(75), 159.0447(20)	C ₁₄ H ₁₂ O ₄
Ethyl protocatechuate	18.39	447.0931	447.0933	–0.49	284.0315(100), 285.0392(75), 327.0497(15), 255.0286(10)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
Dihydrokaempferol-O-rhamnoside	18.49	181.0504	181.0506	–1.02	153.0187(100), 152.0110(15), 109.0289(5)	C ₉ H ₁₀ O ₄
Eriodictyol-O-glucoside	18.77	433.1139	433.1140	–0.38	269.0446(100), 287.0550(40), 259.0603(15)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀
Stilbenoid dimer	19.01	449.1089	449.1089	–0.04	287.0552(100), 151.0031(5)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁
Undefined	19.16	469.1292	469.1293	–0.07	363.0857(100), 375.0857(20), 451.1168(5)	C ₂₈ H ₂₂ O ₇
(tetrahydroxyisoflavanone)	19.18	287.0561	287.0561	–0.18	259.0602(100), 243.0652(20), 201.0547(5)	C ₁₅ H ₁₂ O ₆
Viniferin diglycoside	19.25	777.2397	777.2400	–0.36	615.1854(100), 453.1330(80)	C ₄₀ H ₄₂ O ₁₆
Myricetin	19.39	317.0301	317.0303	–0.63	178.9981(100), 151.0032(45), 192.0058(10)	C ₁₅ H ₁₀ O ₈
Pallidol	19.50	453.1349	453.1344	2.24	359.0922(100), 265.0499(10)	C ₂₈ H ₂₂ O ₆
(<i>E</i>)-resveratrol *	20.23	227.0715	227.0714	0.77	185.0607(100), 183.0816(35), 159.0814(30)	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Stilbenoid dimer (resveratrol dimer)	20.56	453.1351	453.1344	1.57	359.0916(100), 289.0861(5)	C ₂₈ H ₂₂ O ₆

Table 2. Cont.

Compounds	t _R (min)	Accurate Mass [M – H] –	Theo. Mass	Error (ppm)	MS/MS Ions (Intensity)	Molecular Formula
Stilbenoid dimer (maackin)	20.62	485.1242	485.1242	0.01	375.0865(100), 467.1125(15), 363.0863(10)	C ₂₈ H ₂₂ O ₈
Resveratrol-O-hexoside	20.79	615.1868	615.1872	–0.62	453.1334(100)	C ₃₄ H ₃₂ O ₁₁
Eriodictyol *	20.97	287.0558	287.0561	–0.92	151.0031(100), 135.0446(5)	C ₁₅ H ₁₂ O ₆
Stilbenoid tetramer (viniferol E)	21.11	923.2680	923.2674	0.68	905.2576(100), 707.1898(55), 801.2318(50), 881.2573(20), 783.2209(10)	C ₅₆ H ₄₄ O ₁₃
Stilbenoid hexamer (viniphenol A)	21.12	679.1969[M – 2H] ^{2–}	679.1974[M – 2H] ^{2–}	–1.12	585.1543(100), 491.1126(10), 359.0914(5), 905.2584(2.5), 453.1333(2)	C ₈₄ H ₆₄ O ₁₈
Quercetin *	21.16	301.0354	301.0354	0.06	178.9987(100), 151.0038(80)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Hopeaphenol *	21.34	905.2607	905.2627	–2.24	811.2152(100), 717.1741(65), 451.1173(10)	C ₅₆ H ₄₂ O ₁₂
Isohopeaphenol *	21.47	905.2588	905.2568	2.15	811.2178(100), 717.1752(40)	C ₅₆ H ₄₂ O ₁₂
(E)-ε-viniferin *	21.59	453.1348	453.1344	1.03	359.0928(100), 347.0923(50), 435.1238(25)	C ₂₈ H ₂₂ O ₆
(E)-ω-viniferin	21.72	453.1346	453.1344	0.62	359.0927(100), 347.0925(50), 435.1234(30), 411.1233(20)	C ₂₈ H ₂₂ O ₆
Stilbenoid tetramer (vitisin A/B/C/D)	21.90	905.2599	905.2627	–3.05	799.2157(100), 887.2482(70), 811.2158(50), 359.0913(35), 545.1599(15)	C ₅₆ H ₄₂ O ₁₂

* Compounds identified via matching with authentic standards. t_R, retention times. Stilbenoid hexamer appeared as a doubly charged ion.

Of the 42 compounds identified in the present work, 22 had been previously detected in both the analytical and pilot-plant extractions [2,8]: gallic acid (m/z 169.0138, -2.41 ppm), monogalloyl-glucose (m/z 331.0662, -2.65 ppm), protocatechuic acid-*O*-hexoside (1) (m/z 315.0718, -1.07 ppm), protocatechuic acid (m/z 153.0190, -2.16 ppm), protocatechuic acid-*O*-hexoside (2) (m/z 315.0717, -1.30 ppm), syringic acid hexoside (m/z 359.0933, 2.21 ppm), catechin (m/z 289.0722, 1.43 ppm), epicatechin (m/z 289.0715, -1.00 ppm), restrytol (A or B) (m/z 471.1441, -1.86 ppm), taxifolin (m/z 303.0508, -0.78 ppm), astilbin (m/z 449.1084, -1.12 ppm), stilbenoid heterodimer (caraphenol B/C) (m/z 469.1292, -0.06 ppm), eriodictyol-*O*-glucoside (m/z 449.1089, -0.04 ppm), stilbenoid dimer (m/z 469.1292, -0.07 ppm), pallidol (m/z 453.1349, 2.24 ppm), (*E*)-resveratrol (m/z 227.0715, 0.77 ppm), stilbenoid dimer (resveratrol dimer) (m/z 453.1351, 1.57 ppm), resveratrol-*O*-hexoside (m/z 615.1868, -0.62 ppm), eriodictyol (m/z 287.0558, -0.92 ppm), hopeaphenol (m/z 905.2607, -2.24 ppm), isohopeaphenol (m/z 905.2588, 2.15 ppm) and (*E*)- ϵ -viniferin (m/z 453.1348, 1.03 ppm). These findings indicate that these compounds are stable through each step of the production process, including microencapsulation.

On the other hand, seven compounds identified in the microencapsulated extract had previously been detected only in the analytical extraction [8]: procyanidin dimer (1) (m/z 577.1348, -0.69 ppm), procyanidin dimer (2) (m/z 577.1346, -0.35 ppm), epicatechin gallate (m/z 441.0821, -1.30 ppm), (*E*)-piceatannol (m/z 243.0665, 0.79 ppm), viniferin diglycoside (m/z 777.2397, -0.36 ppm), (*E*)- ω -viniferin (m/z 453.1346, 0.62 ppm), and stilbenoid tetramer (vitisin A/B/C/D) (m/z 905.2599, -3.05 ppm). Thus, although these compounds were not detected in the pilot-scale extraction, they were recovered after the microencapsulation process. Similar to our results, the incorporation of β -CD enabled an effective and selective recovery of flavan-3-ols [41] and stilbenes [42], resulting in a cleaner analytical extract phenolic profile. Additionally, three compounds previously detected in the pilot-scale extraction [2]: protocatechuic aldehyde (m/z 137.0241, -2.02 ppm), kaempferol-3-*O*-glucoside (m/z 447.0931, -0.49 ppm), and ethyl protocatechuate (m/z 181.0504, -1.02 ppm), were also recovered and identified in the microencapsulated extract.

Finally, ten compounds were identified only in the IC (GC_{PPE}+HP- β -CD+MD), and not in the analytical or pilot extracts: five flavonoids, three stilbenes, an adduct of β -CD, and a complex of β -CD with (*epi*)catechin.

Flavonoids. The taxifolin isomer (m/z 303.0503, -2.32 ppm) showed ions at m/z 285.0390, owing to the initial loss of a water molecule and ions at m/z 177.0184 and 125.0237 due to cleavage of the C ring, respectively. Quercetin (m/z 301.0354, 0.06 ppm) was identified and confirmed by comparison with a pure standard. Myricetin (m/z 317.0301, -0.63 ppm), tentatively identified by its fragmentation pattern, produced ions at m/z 178.9981 ($^{1,2}A^-$) and 151.0032 ($^{1,3}A^-$) due to retro-Diels–Alder fragmentation [43], and at m/z 192.0058 due to the loss of the B ring. Although they were not identified in our previous studies, these compounds have been recovered, detected, and quantified by other authors using microwave-assisted, subcritical water, and conventional extraction techniques [44].

Dihydrokaempferol-*O*-rhamnoside (engeletin) (m/z 433.1139, -0.38 ppm), a compound previously reported in grape stems [45], was tentatively identified and showed fragment ions at m/z 269.0446, 287.0550, and 259.0603. An undefined tetrahydroxyisoflavanone (m/z 287.0561, -0.18 ppm) gave product ions at m/z 259.0602, 243.0652, and 201.0547, and was provisionally identified as 2,6,7,4'-tetrahydroxyisoflavanone, based on the exact mass and fragmentation pattern. However, as dihydrokaempferol and eriodictyol chalcone have similar structures, the identity of this compound could not be accurately defined using our spectrometric approach.

Stilbenes. A stilbenoid dimer (maackin, Figure 3A) (m/z 485.1242, 0.01 ppm) showed product ions at m/z 467.1125, 375.0865, and 363.0863, which were generated by the loss of a water molecule (18 Da), resorcinol (110 Da), and 2-hydroxy-4-methylenecyclohexa-2,5-dienone (122 Da), respectively [46]. This compound has a structure consisting of two

piceatannol units, and the most likely assignment is maackin A, which was identified previously in *V. vinifera* stalks [47].

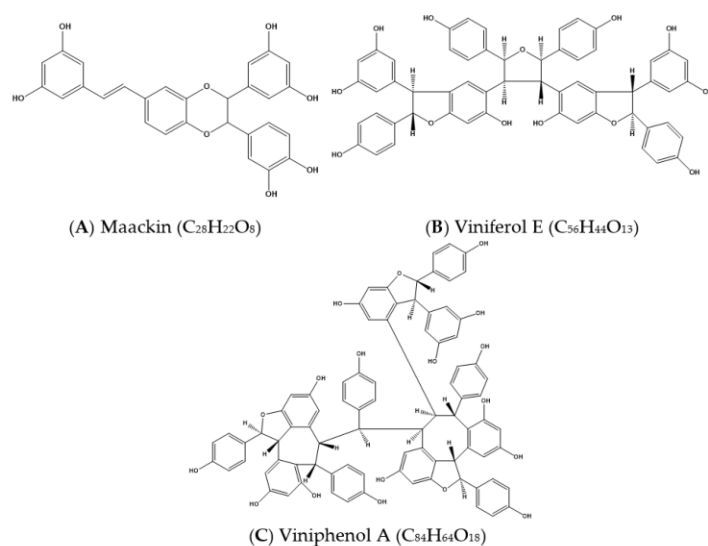


Figure 3. Representative stilbenes tentatively identified in the microencapsulated extract. (A) Maackin (C₂₈H₂₂O₈); (B) Viniferol E (C₅₆H₄₄O₁₃); (C) Viniphenol A (C₈₄H₆₄O₁₈).

A stilbenoid tetramer (Figure 3B) (m/z 923.2680, 0.68 ppm) was tentatively identified as viniferol E and yielded product ions at m/z 905.2576, 881.2573, 801.2318, 783.2209 and 707.1898. The product ions at m/z 905.2576 and 881.2573 were due to a loss of H₂O (18 Da) and C₂H₂O (42 Da), respectively, and at m/z 801.2318 probably to the loss of the group C₇H₆O₂ (122 Da). The ion at m/z 801.2318 was further fragmented to ions at m/z 783.2209 and m/z 707.1898 by the loss of a water molecule (18 Da) and a phenol group (94 Da), respectively. Viniferol E was previously detected and quantified from grapevine canes by subcritical water extraction [48].

A stilbenoid hexamer, viniphenol A (Figure 3C) (m/z 679.1969 [M – 2H]^{2–}, –1.12 ppm), was detected as a doubly charged ion with product ions at m/z 905.2584, 585.1543, 491.1126, 453.1333 and 359.0914. The product ion at m/z 905.2584 shows the presence of a stilbenoid tetramer molecule, probably formed by the loss of a stilbenoid dimer (454 Da) from the deprotonated hexamer. The high-intensity product ion at m/z 585.1543 could be attributed to the loss of a phenol group (94 Da) from the stilbenoid trimer (m/z 679). The product ion at m/z 585.1543 underwent fragmentation to ions at m/z 491.1126 and m/z 359.0914, which could be attributed to the loss of a phenol group (94 Da) and a stilbenoid dimer (226 Da), respectively. Finally, a low intensity stilbenoid dimer fragment was observed at m/z 453.1333. Viniphenol A was previously isolated from *V. vinifera* stalks by centrifugal partition chromatography, while its structure was proposed based on the analysis of spectroscopic data and molecular modeling under NMR conditions [47].

According to the supplier, the HP- β -CD used for encapsulation has a maximum β -CD impurity of 1.5%. The presence of [β -CD + HCOO][–] (m/z 1179.3679, –0.04 ppm) and a complex of (*epi*)catechin with β -CD [β -CD + (*epi*)catechin][–] (m/z 1423.5708, –0.71 ppm) were detected and identified by comparison with the mass spectra reported by Żyżelewicz et al. [49]. The detection of this complex by mass spectrometry confirmed the interaction between polyphenols and cyclodextrins, in agreement with the SEM and FTIR analysis.

3.5. Encapsulation Efficiency

GC_{PPE} is a complex mixture of various compounds that have different physical and chemical properties and abilities to form interactions and bind within the HP- β -CD cavity. As shown earlier, the phenolic compounds in the microencapsulated extract are phenolic acids and derivatives, flavonoids, and stilbenes. The individual EE (%) for twenty of these

compounds was calculated and presented in Table 3. The other compounds were identified but not quantified due to their low amounts (see detail Supplementary Materials Table S1).

Table 3. Encapsulation efficiency (%).

Compounds	EE (%)
Phenolic Acids and Derivatives	
Protocatechuic acid- <i>O</i> -hexoside (1)	54.3 ± 2.4
Protocatechuic acid	66.8 ± 9.8
Ethyl protocatechuate	69.7 ± 5.5
Protocatechuic aldehyde	75.6 ± 4.2
Gallic acid	83.4 ± 0.6
Caftaric acid	87.1 ± 2.2
Ellagic acid pentoside	87.6 ± 0.5
Hydroxybenzaldehyde	95.8 ± 0.6
Weighted Average	81.5 ± 0.7
Flavonoids	
Eriodictyol	74.2 ± 4.7
Quercetin- <i>O</i> -glucoside	81.8 ± 7.0
Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide	88.0 ± 3.1
Astilbin (1)	82.7 ± 2.3
Astilbin (2)	92.0 ± 1.1
Weighted Average	85.2 ± 2.4
Stilbenes	
(<i>E</i>)-resveratrol	32.7 ± 2.8
Stilbenoid tetramer (hopeaphenol/isohopeaphenol)	65.8 ± 8.6
Pallidol	74.6 ± 3.8
(<i>E</i>)- ϵ -viniferin	76.8 ± 3.5
Stilbene dimer (resveratrol dimer)	94.1 ± 2.1
Stilbenoid heterodimer (caraphenol B/C)	96.8 ± 0.4
Restrytisol (A or B)	97.0 ± 0.6
Weighted Average	78.6 ± 1.9
Total Weighted Average	80.5 ± 1.1

Results are given as means $\pm$ standard deviations. For each phenolic class, we calculated the weighted average of the concentration of the respective metabolites. The total weighted average was calculated by weighting all quantified compounds. All encapsulation efficiencies were calculated according to Equation (4) (Section 2.8).

The average EE for all the analyzed compounds was $80.5 \pm 1.1\%$. Several authors have studied the encapsulation of phenolic compounds from wine byproducts using different encapsulation materials. Davidov-Pardo et al. [30] reported a similar polyphenol EE of 82% for a commercial grape seed extract microencapsulated by spray drying using MD as the wall material. Moschona and Liakopoulou-Kyriakides [50] found a low EE of 55% to 79% for grape marc and lees phenolic extracts from white and red wine encapsulated with alginate and chitosan. Lavelli and Sri Harsha [51] also reported a low EE of 68% in a study where alginate hydrogel was used as an agent to encapsulate phenolic compounds from grape skin. Another study using grape skin extracts, encapsulated in water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsions, observed an improved EE of $87.74 \pm 3.12\%$ for anthocyanins [52]. The EE depends on a variety of factors, such as the technique used, the solubility and size of the guest molecule relative to the cavity of the host, the concentrations of the host and guest molecules, the binding constant within the guest and host, etc. [53]. As we did not find a similar study in the literature that employed the same raw material, encapsulant, and analytical methods to determine the concentration of guest molecules, we also analyzed the individual encapsulation of twenty compounds present in the IC (GC_{PPE}+HP- β -CD+MD).

The average EE for the phenolic acids and derivatives was $81.5 \pm 0.7\%$, the lowest value being obtained for protocatechuic acid-*O*-hexoside 1 ($54.3 \pm 2.4\%$) and the highest for hydroxybenzaldehyde ($95.8 \pm 0.6\%$). The EE for protocatechuic acid was $66.8 \pm 9.8\%$,

higher than the value reported by Taofiq et al. [54], who determined an EE of 50.3% for protocatechuic acid encapsulated by the atomization/coagulation technique, using sodium alginate in combination with calcium chloride (CaCl_2) to promote alginate gelation. The EE for hydroxybenzaldehyde obtained here is higher than the value (46.50%) reported for *p*-hydroxybenzaldehyde in a β -CD inclusion complex [55].

The EE for gallic acid, $83.4 \pm 0.6\%$, was slightly higher than the value reported by da Rosa et al. [56], who determined an EE of $80.0 \pm 1.4\%$ for microencapsulated gallic acid using β -CD and the lyophilization method. However, Olga et al. [53] obtained a higher EE of 89.22% in a complex with HP- β -CD, a result that was reduced to 77.34% when the gallic acid was co-encapsulated with *trans*-ferulic acid. The authors suggested a possible antagonistic relationship between the two phenols in the HP- β -CD cavity.

The EE of $87.6 \pm 0.5\%$ observed for ellagic acid pentoside was considerably higher than the 55.2% reported for ellagic acid (aglycone) encapsulated with polyvinyl alcohol [57]. The EE for caftaric acid—a hydroxycinnamic acid—was very high ($87.1 \pm 2.2\%$) in comparison with the values reported for other hydroxycinnamic acids, such as the essential oil-encapsulated chitosan-*p*-coumaric acid ($42 \pm 1\%$) [58] and chlorogenic acid (77.5%) in β -CD nanosponges [59], respectively. Finally, to our knowledge, this is the first time that the EE for ethyl protocatechuate ($69.7 \pm 5.5\%$) and protocatechuic aldehyde ($75.6 \pm 4.2\%$) has been reported.

The average EE for flavonoids was $85.2 \pm 2.4\%$. The values for astilbin isomer (2) and astilbin (1) were particularly high, $92.0 \pm 1.1\%$ and $82.7 \pm 2.3\%$, respectively. Zheng and Zhang [60] reported a lower EE of 80.1% for astilbin encapsulated with zein–caseinate nanoparticles by the antisolvent method.

Quercetin-3-*O*-glucuronide ($88.0 \pm 3.1\%$) and quercetin-*O*-glucoside (81.8 ± 7.0) also had high EE values. Tchabo et al. [61] obtained a lower EE (63.90–66.45%) for quercetin-3-*O*-glucoside in a spray-dried mulberry leaf extract prepared with MD, yet the EE was higher (91.71–93.95%) when sodium carboxymethyl cellulose was used. To the best of our knowledge, no EE values have been previously reported for quercetin-3-*O*-glucuronide.

The EE for eriodictyol was $74.2 \pm 4.7\%$, similar to the almost 70% reported for naringenin (another flavanone) in polymer PLGA nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion-evaporation method [62].

The stilbene group had the lowest mean EE ($78.6 \pm 1.9\%$), mainly because of the low value obtained for (*E*)-resveratrol ($32.7 \pm 2.8\%$). Nevertheless, previous studies have shown that the cyclodextrin encapsulation of resveratrol increases its solubility, stability, and bioactivity (antioxidant and anticarcinogenic properties) [15]. Furthermore, the HP- β -CD complex exhibits a strong H-bonding interaction with molecules such as oxyresveratrol [63]. In our study, we found a high EE ($97.0 \pm 0.6\%$) for restrytisol (A or B), an oxidized resveratrol dimer, which may be related to the van der Waals force interaction and hydrogen bonding between the guest compound and the HP- β -CD.

A good EE was obtained for stilbene dimers such as pallidol ($74.6 \pm 3.8\%$), (*E*)- ϵ -viniferin ($76.8 \pm 3.5\%$), and an undefined resveratrol dimer ($94.1 \pm 2.1\%$). Previously, ϵ -viniferin, a resveratrol dimer, was encapsulated in phospholipid-based multi-lamellar liposomes called spherulites or onions. This formulation gave a lower EE ($58 \pm 3\%$) than in our study, but increased the water solubility of this stilbene more than five-fold and provided protection against its UV-induced isomerization [64]. Finally, the low EE ($65.8 \pm 8.6\%$) obtained for the stilbenoid tetramer is probably due to its large size and polar surface area.

3.6. Antioxidant Capacity

Several authors suggest that the antioxidant capacity of phenolic compounds is improved by encapsulation in cyclodextrins [15]. The ORAC value has been applied to standardize the antioxidant activity of herbal extracts and foods, and is widely used as an accurate indicator of antioxidant activity in vivo [65].

The antioxidant capacity of the IC ($\text{GC}_{\text{PPE}} + \text{HP-}\beta\text{-CD} + \text{MD}$) by ORAC-FL was $5300 \pm 472 \mu\text{mol TE/g DW}$, similar to the $4612 \pm 155 \mu\text{mol TE/g DW}$ reported in

our previous GC_{PPE} study [2]. The GC_{PPE} microencapsulated with HP- β -CD retains its antioxidant capacity and its formulation may improve stability, solubility, and bioavailability for applications in the food, cosmetic and pharmaceutical industries.

4. Conclusions

Phenolic compounds from a grape cane pilot-plant extract were successfully encapsulated in an inclusion complex (GC_{PPE}+HP- β -CD+MD). The microencapsulated extract was rich in stilbenes, especially oligomers, flavonoids, and phenolic acids. A complex of (*epi*)catechin and β -CD was detected by mass spectrometry, which confirmed the interaction between polyphenols and cyclodextrin. The formation of the inclusion complex was also supported by FTIR-ATR and SEM analyses. HP- β -CD provided a high EE for phenolic compounds, with a mean of $80.5 \pm 1.1\%$, the highest values being obtained for resveratrol ($97.0 \pm 0.6\%$), stilbenoid heterodimer (1) ($96.8 \pm 0.4\%$) and hydroxybenzaldehyde ($95.8 \pm 0.6\%$), and the lowest for (*E*)-resveratrol ($32.7 \pm 2.8\%$). The antioxidant capacity of the inclusion complex was similar to the unencapsulated extract. Considering the protection afforded the phenolic compounds by the inclusion complex, it is expected that the formulation may improve their stability, solubility, and bioavailability in water-soluble applications for the food and pharmaceutical industries.

5. Patents

The preparation of grape canes before extraction in the pilot plant followed the procedure described in the Patent [13]. The formulation of the microparticles of phenolic compounds from the extract of grape canes of *V. vinifera* and the application of HP- β -CD to form the IC and the use of MD as a coating agent are described in the Patent [17].

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox10071130/s1>, Table S1: Identification and quantification of phenolic compounds from GC_{PPE} using LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS in negative mode.

Author Contributions: Conceptualization, D.E.-A., C.G.-G., C.M., J.L., D.v.B. and A.V.-Q.; methodology, D.E.-A., J.A.-G., J.S., J.L.-C., C.G.-G., J. L. and A.V.-Q.; validation, A.V.-Q. and C.G.-G.; formal analysis, D.E.-A., J.A.-G., J.L.-C. and J.S.; investigation, D.E.-A., J.A.-G. and J.S.; resources, A.V.-Q., C.G.-G., R.M.L.-R., C.M., J.L. and D.v.B.; data curation, D.E.-A., J.A.-G. and J.S.; writing—original draft preparation, D.E.-A.; writing—review and editing, D.E.-A., A.V.-Q., C.G.-G., C.M., J.A.-G., D.v.B., R.M.L.-R. and J.S.; visualization, D.E.-A.; supervision, A.V.-Q., C.G.-G., R.M.L.-R. and C.M.; project administration, D.E.-A., A.V.-Q., C.G.-G., C.M. and R.M.L.-R.; funding acquisition, D.E.-A., C.M., A.V.-Q. and R.M.L.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID)/PCI-REDES170051; ANID PIA/APOYO CCTE AFB170007; CORFO 14 IDL2- 30156, from Chile; CICYT [AGL2016-75329-R], CIBEROBN from the Instituto de Salud Carlos III, ISCIII from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, (AEI/FEDER, UE) and Generalitat de Catalunya (GC) [2017SGR 196]. Danilo Escobar-Avello is grateful to ANID/Scholarship Program/DOCTORADO BECAS CHILE/2017—72180476. Javier Avendaño-Godoy is grateful to ANID/Scholarship Program/DOCTORADO NACIONAL/2020-21202096. Anna Vallverdú-Queralt thanks to the Ministry of Science, Innovation and Universities for the Ramon y Cajal contract (RYC-2016-19355).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: The authors would like to thank the CCiT-UB for the mass spectrometry equipment and to Yamil Neira from Viña de Neira, who provided the grape cane samples.

Conflicts of Interest: Rosa M. Lamuela-Raventós reports receiving lecture fees from Cerveceros de España and Wine in moderation. She also received lecture fees and travel support from Adventia. The other authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study;

in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Melini, V.; Melini, F.; Luziatelli, F.; Ruzzi, M. Functional ingredients from agri-food waste: Effect of inclusion thereof on phenolic compound content and bioaccessibility in bakery products. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1216. [\[CrossRef\]](#)
- Escobar-Avello, D.; Mardones, C.; Sáez, V.; Riquelme, S.; von Baer, D.; Lamuela-Raventós, R.M.; Vallverdú-Queralt, A. Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from grape canes: Comprehensive characterization by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *Food Res. Int.* **2021**, *143*, 110265. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sun, X.; Wei, X.; Zhang, J.; Ge, Q.; Liang, Y.; Ju, Y.; Zhang, A.; Ma, T.; Fang, Y. Biomass estimation and physicochemical characterization of winter vine prunings in the Chinese and global grape and wine industries. *Waste Manag.* **2020**, *104*, 119–129. [\[CrossRef\]](#)
- Troilo, M.; Difonzo, G.; Paradiso, V.M.; Summo, C.; Caponio, F. Bioactive Compounds from Vine Shoots, Grape Stalks, and Wine Lees: Their Potential Use in Agro-Food Chains. *Foods* **2021**, *10*, 342. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Malinowska, M.A.; Billet, K.; Drouet, S.; Munsch, T.; Unlubayir, M.; Tungmunthum, D.; Giglioli-Guivarc'H, N.; Hano, C.; Lanoue, A. Grape cane extracts as multifunctional rejuvenating cosmetic ingredient: Evaluation of sirtuin activity, tyrosinase inhibition and bioavailability potential. *Molecules* **2020**, *25*, 2203. [\[CrossRef\]](#)
- Díaz-Galindo, E.P.; Nesic, A.; Cabrera-Barjas, G.; Mardones, C.; Von Baer, D.; Bautista-Baños, S.; Garcia, O.D. Physical-chemical evaluation of active food packaging material based on thermoplastic starch loaded with grape cane extract. *Molecules* **2020**, *25*, 1306. [\[CrossRef\]](#)
- Dávila, I.; Gullón, P.; Andrés, M.A.; Labidi, J. Coproduction of lignin and glucose from vine shoots by eco-friendly strategies: Toward the development of an integrated biorefinery. *Bioresour. Technol.* **2017**, *244*, 328–337. [\[CrossRef\]](#)
- Escobar-Avello, D.; Lozano-Castellón, J.; Mardones, C.; Pérez, A.J.; Sáez, V.; Riquelme, S.; Von Baer, D.; Vallverdú-Queralt, A. Phenolic profile of grape canes: Novel compounds identified by LC-ESI-LTQ-orbitrap-MS. *Molecules* **2019**, *24*, 3763. [\[CrossRef\]](#)
- Sáez, V.; Pastene, E.; Vergara, C.; Mardones, C.; Hermosín-gutiérrez, I.; Gómez-Alonso, S.; Gómez, M.V.; Theoduloz, C.; Riquelme, S.; Baer, D. Von Oligostilbenoids in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir grape cane extract: Isolation, characterization, in vitro antioxidant capacity and anti-proliferative effect on cancer cells. *Food Chem.* **2018**, *265*, 101–110. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pinasseau, L.; Vallverdú-Queralt, A.; Verbaere, A.; Roques, M.; Meudec, E.; Le Cunff, L.; Péros, J.-P.; Ageorges, A.; Sommerer, N.; Boulet, J.-C.; et al. Cultivar diversity of grape skin polyphenol composition and changes in response to drought investigated by LC-MS based metabolomics. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*. [\[CrossRef\]](#)
- Lambert, C.; Richard, T.; Renouf, E.; Bisson, J.; Waffo-Tégou, P.; Bordenave, L.; Ollat, N.; Mérillon, J.M.; Cluzet, S. Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11392–11399. [\[CrossRef\]](#)
- Vergara, C.; Von Baer, D.; Mardones, C.; Wilkens, A.; Wernekinck, K.; Damm, A.; Macke, S.; Gorena, T.; Winterhalter, P. Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 929–933. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mardones, C.; Von Baer, D.; Vergara, C.; Escobar-Avello, D.; Fuentealba, C.; Riquelme, S. Un procedimiento para aumentar el contenido de estilbenos, esencialmente resveratrol, en sarmientos provenientes de las podas de *Vitis vinífera*. 2014. CL2014003417A1. Available online: <https://patentscope.wipo.int/search/es/detail.jsf?docId=CL174158667> (accessed on 13 July 2021).
- Zwingelstein, M.; Draye, M.; Besombes, J.L.; Piot, C.; Chatel, G. Trans-Resveratrol and trans- ϵ -Viniferin in Grape Canes and Stocks Originating from Savoie Mont Blanc Vineyard Region: Pre-extraction Parameters for Improved Recovery. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7*, 8310–8316. [\[CrossRef\]](#)
- Pinho, E.; Grootveld, M.; Soares, G.; Henriques, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *101*, 121–135. [\[CrossRef\]](#)
- Riquelme, S.; Sáez, V.; Escobar, D.; Vergara, C.; Fuentealba, C.; Bustamante, L.; von Baer, D.; Jara, P.; Lamperti, L.; Mardones, C. Bench-scale extraction of stilbenoids and other phenolics from stored grape canes (*Vitis vinifera*): Optimization process, chemical characterization, and potential protection against oxidative damage. *J. Chil. Chem. Soc.* **2019**, *64*, 4414–4420. [\[CrossRef\]](#)
- Mardones, C.; Escobar-Avello, D.; Luengo-Contreras, J.; Avendaño-Godoy, J.; Ortega-Medina, E. Formulación de micropartículas de extracto de sarmientos de *Vitis vinífera* útil en las industrias nutracéutica y cosmética, además de su proceso de elaboración y sus usos. 2017. CL2017002902A1. Available online: <https://patentscope.wipo.int/search/es/detail.jsf?docId=CL250856147> (accessed on 13 July 2021).
- Dadi, D.W.; Emire, S.A.; Hagos, A.D.; Eun, J.B. Physical and Functional Properties, Digestibility, and Storage Stability of Spray- and Freeze-Dried Microencapsulated Bioactive Products from *Moringa stenopetala* Leaves Extract. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *156*, 112891. [\[CrossRef\]](#)
- Leyva-Jiménez, F.J.; Lozano-Sánchez, J.; de la Luz Cádiz-Gurrea, M.; Fernández-Ochoa, Á.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A. Spray-drying microencapsulation of bioactive compounds from lemon verbena green extract. *Foods* **2020**, *9*, 1547. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jinapong, N.; Supphantharika, M.; Jamnong, P. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *J. Food Eng.* **2008**, *84*, 194–205. [\[CrossRef\]](#)

21. Gómez-Gaete, C.; Retamal, M.; Chávez, C.; Bustos, P.; Godoy, R.; Torres-Vergara, P. Development, characterization and in vitro evaluation of biodegradable rhein-loaded microparticles for treatment of osteoarthritis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *96*, 390–397. [\[CrossRef\]](#)
22. García, D.E.; Delgado, N.; Aranda, F.L.; Toledo, M.A.; Cabrera-Barjas, G.; Sintjago, E.M.; Escobar-Avello, D.; Paczkowski, S. Synthesis of maleilated polyflavonoids and lignin as functional bio-based building-blocks. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *123*, 154–163. [\[CrossRef\]](#)
23. Santos, J.; Delgado, N.; Fuentes, J.; Fuentealba, C.; Vega-Lara, J.; García, D.E. Exterior grade plywood adhesives based on pine bark polyphenols and hexamine. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *122*, 340–348. [\[CrossRef\]](#)
24. Escobar-Avello, D.; Olmo-Cunillera, A.; Lozano-Castellón, J.; Marhuenda-Muñoz, M.; Vallverdú-Queralt, A. A Targeted Approach by High Resolution Mass Spectrometry to Reveal New Compounds in Raisins. *Molecules* **2020**, *25*, 1281. [\[CrossRef\]](#)
25. Sasot, G.; Martínez-Huélamo, M.; Vallverdú-Queralt, A.; Mercader-Martí, M.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Identification of phenolic metabolites in human urine after the intake of a functional food made from grape extract by a high resolution LTQ-Orbitrap-MS approach. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 435–444. [\[CrossRef\]](#)
26. Robert, P.; Goren, T.; Romero, N.; Sepulveda, E.; Chavez, J.; Saenz, C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2010**, *45*, 1386–1394. [\[CrossRef\]](#)
27. Radünz, M.; Hackbart, H.C.D.S.; Bona, N.P.; Pedra, N.S.; Hoffmann, J.F.; Stefanello, F.M.; Da Rosa Zavareze, E. Glucosinolates and phenolic compounds rich broccoli extract: Encapsulation by electrospraying and antitumor activity against glial tumor cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2020**, *192*. [\[CrossRef\]](#)
28. Ou, B.; Chang, T.; Huang, D.; Prior, R.L. Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: First action 2012.23. *J. AOAC Int.* **2013**, *96*, 1372–1376. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Urzúa, C.; González, E.; Dueik, V.; Bouchon, P.; Giménez, B.; Robert, P. Olive leaves extract encapsulated by spray-drying in vacuum fried starch–gluten doughs. *Food Bioprod. Process.* **2017**, *106*, 171–180. [\[CrossRef\]](#)
30. Davidov-Pardo, G.; Arozarena, I.; Marín-Arroyo, M.R. Optimization of a Wall Material Formulation to Microencapsulate a Grape Seed Extract Using a Mixture Design of Experiments. *Food Bioprocess Technol.* **2013**, *941–951*. [\[CrossRef\]](#)
31. Fernandes, R.V.D.B.; Borges, S.V.; Botrel, D.A. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *101*, 524–532. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Siede Kuck, L.; Pelayo Zapata Noreña, C. Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chem.* **2015**. [\[CrossRef\]](#)
33. Tolun, A.; Altintas, Z.; Artik, N. Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *J. Biotechnol.* **2016**, *239*, 23–33. [\[CrossRef\]](#)
34. Li, W.; Ran, L.; Liu, F.; Hou, R.; Zhao, W.; Li, Y.; Wang, C.; Dong, J. Preparation and Characterisation of Polyphenol-HP- β -Cyclodextrin Inclusion Complex that Protects Lamb Tripe Protein against Oxidation. *Molecules* **2019**, *24*, 4487. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Franco, P.; De Marco, I. Preparation of non-steroidal anti-inflammatory drug/ β -cyclodextrin inclusion complexes by supercritical antisolvent process. *J. CO₂ Util.* **2021**, *44*. [\[CrossRef\]](#)
36. Grasel, F.D.S.; Ferrão, M.F.; Wolf, C.R. Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. *Spectrochimica Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2016**, *153*, 94–101. [\[CrossRef\]](#)
37. Santos, J.; Pereira, J.; Ferreira, N.; Paiva, N.; Ferra, J.; Magalhães, F.D.; Martins, J.M.; Dulyanska, Y.; Carvalho, L.H. Valorisation of non-timber by-products from maritime pine (*Pinus pinaster*, Ait) for particleboard production. *Ind. Crop. Prod.* **2021**, *168*, 113581. [\[CrossRef\]](#)
38. Rodríguez-López, M.I.; Mercader-Ros, M.T.; López-Miranda, S.; Pellicer, J.A.; Pérez-Garrido, A.; Pérez-Sánchez, H.; Núñez-Delgado, E.; Gabaldón, J.A. Thorough characterization and stability of HP- β -cyclodextrin thymol inclusion complexes prepared by microwave technology: A required approach to a successful application in food industry. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 1322–1333. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Reddy, C.K.; Jung, E.S.; Son, S.Y.; Lee, C.H. Inclusion complexation of catechins-rich green tea extract by β -cyclodextrin: Preparation, physicochemical, thermal, and antioxidant properties. *LWT* **2020**, *131*, 109723. [\[CrossRef\]](#)
40. Yuan, C.; Liu, B.; Liu, H. Characterization of hydroxypropyl- β -cyclodextrins with different substitution patterns via FTIR, GC-MS, and TG-DTA. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *118*, 36–40. [\[CrossRef\]](#)
41. Ratnasooriya, C.C.; Rupasinghe, H.P.V. Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. *Food Chem.* **2012**, *134*, 625–631. [\[CrossRef\]](#)
42. Chemat, F.; Vian, M.A.; Cravotto, G. Green extraction of natural products: Concept and principles. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 8615–8627. [\[CrossRef\]](#)
43. Lin, Y.; Wu, B.; Li, Z.; Hong, T.; Chen, M.; Tan, Y.; Jiang, J.; Huang, C. Metabolite identification of myricetin in rats using HPLC coupled with ESI-MS. *Chromatographia* **2012**, *75*, 655–660. [\[CrossRef\]](#)
44. Moreira, M.M.; Barroso, M.F.; Porto, J.V.; Ramalhosa, M.J.; Švarc-Gajić, J.; Estevinho, L.; Morais, S.; Delerue-Matos, C. Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds. *Sci. Total Environ.* **2018**, *634*, 831–842. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Goufo, P.; Singh, R.K.; Cortez, I. A reference list of phenolic compounds (Including stilbenes) in grapevine (*Vitis vinifera* L.) roots, woods, canes, stems, and leaves. *Antioxidants* **2020**, *9*, 398. [\[CrossRef\]](#)

46. Moss, R.; Mao, Q.; Taylor, D.; Saucier, C. Investigation of monomeric and oligomeric wine stilbenoids in red wines by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 1815–1827. [\[CrossRef\]](#)
47. Papastamoulis, Y.; Richard, T.; Nassra, M.; Badoc, A.; Krisa, S.; Harakat, D.; Monti, J.P.; Mérillon, J.M.; Waffo-Teguo, P. Viniphenol A, a complex resveratrol hexamer from *Vitis vinifera* stalks: Structural elucidation and protective effects against amyloid- β -induced toxicity in PC12 cells. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 213–217. [\[CrossRef\]](#)
48. Gabaston, J.; Leborgne, C.; Valls, J.; Renouf, E.; Richard, T.; Waffo-Teguo, P.; Mérillon, J.M. Subcritical water extraction of stilbenes from grapevine by-products: A new green chemistry approach. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *126*, 272–279. [\[CrossRef\]](#)
49. Żyżelewicz, D.; Oracz, J.; Kaczmarek, M.; Budryn, G.; Grzelczyk, J. Preparation and characterization of inclusion complex of (+)-catechin with β -cyclodextrin. *Food Res. Int.* **2018**, *113*, 263–268. [\[CrossRef\]](#)
50. Moschona, A.; Liakopoulou-Kyriakides, M. Encapsulation of biological active phenolic compounds extracted from wine wastes in alginate-chitosan microbeads. *J. Microencapsul.* **2018**, *35*, 229–240. [\[CrossRef\]](#)
51. Lavelli, V.; Sri Harsha, P.S.C. Microencapsulation of grape skin phenolics for pH controlled release of antiglycation agents. *Food Res. Int.* **2019**, *119*, 822–828. [\[CrossRef\]](#)
52. Xu, W.; Yang, Y.; Xue, S.J.; Shi, J.; Lim, L.T.; Forney, C.; Xu, G.; Bamba, B.S.B. Effect of in vitro digestion on water-in-oil-in-water emulsions containing anthocyanins from grape skin powder. *Molecules* **2018**, *23*, 2808. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Olga, G.; Styliani, C.; Ioannis, R.G. Coencapsulation of Ferulic and Gallic acid in hp-b-cyclodextrin. *Food Chem.* **2015**, *185*, 33–40. [\[CrossRef\]](#)
54. Taofiq, O.; Heleno, S.A.; Calhella, R.C.; Fernandes, I.P.; Alves, M.J.; Barros, L.; González-Paramás, A.M.; Ferreira, I.C.F.R.; Barreiro, M.F. Phenolic acids, cinnamic acid, and ergosterol as cosmeceutical ingredients: Stabilization by microencapsulation to ensure sustained bioactivity. *Microchem. J.* **2019**, *147*, 469–477. [\[CrossRef\]](#)
55. Zeng, Z.; Fang, Y.; Ji, H. Side chain influencing the interaction between β -cyclodextrin and vanillin. *Flavour Fragr. J.* **2012**, *27*, 378–385. [\[CrossRef\]](#)
56. Da Rosa, C.G.; Borges, C.D.; Zambiasi, R.C.; Nunes, M.R.; Benvenuti, E.V.; da Luz, S.R.; D’Avila, R.F.; Rutz, J.K. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *46*, 138–146. [\[CrossRef\]](#)
57. Bala, I.; Bhardwaj, V.; Hariharan, S.; Kharade, S.V.; Roy, N.; Kumar, M.N.V.R. Sustained release nanoparticulate formulation containing antioxidant-ellagic acid as potential prophylaxis system for oral administration. *J. Drug Target.* **2006**, *14*, 27–34. [\[CrossRef\]](#)
58. Silva Damasceno, E.T.; Almeida, R.R.; de Carvalho, S.Y.B.; de Carvalho, G.S.G.; Mano, V.; Pereira, A.C.; de Lima Guimarães, L.G. Lippia organoides Kunth. essential oil loaded in nanogel based on the chitosan and p -coumaric acid: Encapsulation efficiency and antioxidant activity. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *125*, 85–94. [\[CrossRef\]](#)
59. Ramírez-Ambrosi, M.; Caldera, F.; Trotta, F.; Berrueta, L.; Gallo, B. Encapsulation of apple polyphenols in β -CD nanosponges. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2014**, *80*, 85–92. [\[CrossRef\]](#)
60. Zheng, D.; Zhang, Q.F. Bioavailability enhancement of astilbin in rats through zein–caseinate nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 5746–5753. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Tchabo, W.; Ma, Y.; Kaptso, G.K.; Kwaw, E.; Cheno, R.W.; Xiao, L.; Osae, R.; Wu, M.; Farooq, M. Process Analysis of Mulberry (*Morus alba*) Leaf Extract Encapsulation: Effects of Spray Drying Conditions on Bioactive Encapsulated Powder Quality. *Food Bioprocess Technol.* **2019**, *12*, 122–146. [\[CrossRef\]](#)
62. Maity, S.; Chakraborti, A.S. Formulation, physico-chemical characterization and antidiabetic potential of naringenin-loaded poly D, L lactide-co-glycolide (N-PLGA) nanoparticles. *Eur. Polym. J.* **2020**, *134*, 109818. [\[CrossRef\]](#)
63. He, J.; Zheng, Z.P.; Zhu, Q.; Guo, F.; Chen, J. Encapsulation mechanism of oxyresveratrol by β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin and computational analysis. *Molecules* **2017**, *22*, 1801. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Courtois, A.; Garcia, M.; Krisa, S.; Atgié, C.; Sauviant, P.; Richard, T.; Faure, C. Encapsulation of ϵ -viniferin in onion-type multi-lamellar liposomes increases its solubility and its photo-stability and decreases its cytotoxicity on Caco-2 intestinal cells. *Food Funct.* **2019**, *10*, 2573–2582. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Jaffe, R.; Mani, J. *Polyphenolics Evoke Healing Responses: Clinical Evidence and Role of Predictive Biomarkers*, 2nd ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2018; ISBN 9780128130063.

DISCUSIÓN GENERAL



4 DISCUSIÓN GENERAL

La discusión general de esta tesis doctoral se presenta a continuación como una forma de profundizar en el análisis de los resultados descritos anteriormente en cada una de las publicaciones. Para llevar a cabo este estudio, en la **Publicación 1**, se realizó una identificación de compuestos fenólicos de extractos de sarmientos de la variedad Pinot Noir producido a escala analítica, utilizando LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. Este primer paso permitió conocer de manera integral la identidad fenólica de los sarmientos de vid, a una escala controlada y bajo metodologías de extracción y caracterización previamente validadas por el grupo de investigación [22,42,109]. Es importante indicar que para los tres artículos que componen esta tesis doctoral se recolectaron sarmientos desde el mismo viñedo y se conservaron bajo las mismas condiciones de almacenamiento, de manera de evitar la variabilidad asociada al tipo de cultivar y a la zona geográfica de cultivo. Todas las muestras de sarmientos utilizadas corresponden a la variedad Pinot Noir y fueron recolectadas en un viñedo orgánico (Viña de Neira) ubicado en el sur de Chile. La elección de esta cepa es relevante, debido a que Pinot Noir es una de las variedades más cultivadas y extendidas en el mundo estimándose en unas 112,000 hectáreas plantadas [51]. Otro aspecto metodológico importante de resaltar es que posterior a la recolección, las muestras de sarmientos fueron cortadas en piezas de entre 30-50 cm y almacenadas a temperatura ambiente por al menos 3 meses, utilizando una metodología previamente patentada [57] (Ver capítulo 8.2.1). Mediante este método un aumento significativo estilbenos totales de hasta 5 veces fue observado en sarmientos de la misma variedad [53]. Aunque el procedimiento de extracción se encuentra explicado en la **Publicación 1**, algunas consideraciones metodológicas y discusión de los resultados son importantes de mencionar para analizar el trabajo de manera global.

La extracción de laboratorio en este primer trabajo se realizó utilizando 0.5g de sarmientos, seleccionados azarosamente de un total recolectado de 500 kg de sarmientos previamente recolectados y almacenados. En la **Publicación 1** el proceso de extracción se realizó a escala analítica y se utilizó una mezcla de etanol/agua (80:20, v/v), que fue la misma empleada posteriormente en la extracción a escala piloto (**Publicación 2**). La gran diferencia entre estas dos extracciones fue el uso de ultrasonido aplicado en la extracción analítica y la baja temperatura utilizada en este sistema de laboratorio. Como

fue mencionado previamente el perfil fenólico es altamente dependiente tanto de los métodos como de las condiciones de extracción utilizadas, por lo que esta consideración podría limitar una comparación directa entre ambos métodos de extracción. Sin embargo, el ejercicio comparativo de evaluar distintas escalas de extracción tiene como finalidad plantear diferencias entre sistemas ampliamente empleados a escala de laboratorio y reportados en literatura, con sistemas de extracción que pueden ser aplicados a nivel industrial y adoptados por empresas productivas en todo el mundo y de los cuáles se tiene escasa información. Teniendo en cuenta estas consideraciones y con la finalidad de conocer de manera completa el perfil fenólico de los extractos a una escala analítica es que las muestras fueron analizadas y caracterizados mediante LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS en modo negativo, siguiendo los modos de adquisición de datos de escaneo completo y adquisición dependiente de datos. Como se mencionó en el apartado 1.2.3.4 (LTQ-Orbitrap), el modo de escaneo completo permite adquirir una amplia gama de información sobre iones precursores con un amplio rango m/z lo que proporciona una poderosa herramienta de análisis para detección y cuantificación de alta resolución y precisión de masa. Mientras que el modo de adquisición dependiente de datos entrega grandes ventajas en la selectividad de iones precursores de interés [40]. De esta manera, en la **Publicación 1**, 75 compuestos fenólicos fueron identificados utilizando información relacionada a su masa exacta, masa teórica, tiempos de retención, fórmula molecular, error (ppm) entre la masa encontrada y la masa exacta de cada compuesto, y los iones fragmento MS/MS con sus respectivas intensidades. Esta información fue comparada con bases de datos de espectros de masas (Metlin, FooDB, PhytoHub, MetFrag, entre otras) y literatura, proporcionándonos una identificación “tentativa” de los compuestos reportados. Además, en esta primera publicación 12 compuestos fenólicos fueron identificados comparando sus tiempos de retención y sus masas y fragmentos con patrones puros, entregándonos un alto nivel de confianza en la identidad de estos compuestos. En este punto es importante mencionar que, para una identificación definitiva e inequívoca de los compuestos no identificados mediante comparación con sus patrones, se deben utilizar otros métodos alternativos de elucidación estructural como técnicas de RMN. La desventaja del uso de RMN es que en muchos casos requiere de largos procesos de purificación de las muestras y generalmente permiten identificar un número más limitado de compuestos en comparación con los métodos basados en espectrometría de masas.

En lo que respecta al análisis y discusión de los resultados de la **Publicación 1**, podemos mencionar que, de los 75 compuestos identificados, 17 compuestos fueron reportados por primera vez, en sarmientos de vid. Entre ellos, la mayoría fueron derivados de hexósidos, como por ejemplo el hexósido de ácido elágico, miricetina-*O*-hexósido, eriodictiol-*O*-hexósido o el dímero de resveratrol-*O*-hexósido. El uso de Orbitrap mediante condiciones metodológicas similares de cromatografía y espectrometría de masas, ya había demostrado antes su capacidad de identificar nuevos compuestos glicosilados en matrices alimenticias. Cabe indicar que, estos compuestos son difíciles de detectar debido a que muchas veces se presentan en bajas concentraciones en las muestras analizadas [42,109]. Los glucósidos de flavonoides son compuestos que han mostrado actividades antidiabéticas, antiinflamatoria, antidegranulante, antiestrés y antialérgica similares o incluso mayores que sus respectivas agliconas flavonoides, lo que se ha determinado en estudios *in vivo* [110]. Por lo tanto, su identificación es relevante para proyectar futuras aplicaciones y efectos biológicos de los extractos de sarmientos de vid.

Otro resultado relevante de este primer artículo fue el profundo análisis de identificación que se realizó a las proantocianidinas poliméricas también conocidas como taninos condensados. Se reportó por primera vez, hasta donde sabemos, la presencia de (*epi*)galocatequina y de procianidinas pentaméricas. Además, en un esfuerzo por profundizar en la identidad estructural de estos compuestos se propuso la secuencia específica de cada prodelfinidina y derivado de galato reportado. En este sentido, el mecanismo de fragmentación denominado *quinone methide* (QM) que implica la escisión del enlace interflavano que conecta las unidades monoméricas de estos compuestos, fue crucial para determinar cada una de sus secuencias, proporcionando iones fragmento específicos y claves para su identificación (ver figura 4, **Publicación 1**). Las prodelfinidinas son un grupo de compuestos fenólicos escasamente estudiados, debido a la falta de estándares comerciales disponibles y a la dificultad para detectarlos y aislarlos de fuentes naturales. Sin embargo, se presentan en una gran variedad de alimentos y bebidas como vino, cerveza, té, cereales, legumbres, frutos secos, uvas, pasas, entre otros [111,112]. Por lo tanto, la exhaustiva caracterización estructural de estos compuestos puede ayudar a otros investigadores a la identificación de prodelfinidinas en fuentes dietéticas o en otros extractos naturales utilizando métodos de espectrometría de masas de alta resolución. Finalmente, logramos cumplir con el objetivo específico 1 de la presente tesis doctoral, contando con un

conocimiento acabado de las identidades fenólicas de los extractos de sarmientos a una escala analítica. Con este conocimiento de base se llevó a cabo la extracción piloto en condiciones industriales, para analizar los efectos del procesamiento en el perfil fenólico del extracto de sarmientos.

La extracción de compuestos fenólicos desde sarmientos de vid a escala de planta piloto fue realizada en un reactor de acero inoxidable con un volumen de trabajo de 750 L (Figura 5-A). Los sarmientos se trituraron en un molino semiindustrial (Figura 5-B) hasta alcanzar un tamaño de partícula inferior a 1 cm. Es importante mencionar que el tamaño de partícula es un parámetro relevante a la hora de evaluar los rendimientos de extracción de compuestos fenólicos. En general una disminución en el tamaño de partícula aumenta los rendimientos de extracción de compuestos fenólicos en sarmientos y se ha observado que el tamaño de partícula óptimo estaría alrededor de los 0.5 cm [8,32,113]. En trabajos anteriores (Ver punto 8.1.3, Publicación 6) observamos que la reducción del tamaño de partícula de 2.0 a 1.0 cm incrementó los rendimientos de extracción de estilbenos totales en un 37%, mientras que la reducción de 1.0 a 0.5 cm solo incrementó los rendimientos de extracción en un 7% [8]. Por otro lado, una reducción del tamaño de partícula aumenta los costos de energía asociados a la etapa de molienda. Por lo tanto, por esta y otras razones técnicas de configuración de la planta piloto empleada, se decidió hacer la extracción con sarmientos de 1 cm [8,114]. Las demás condiciones de extracción temperatura 80 °C, tiempo 100 min; relación sólido/líquido 1:10, también fueron optimizadas durante el trabajo previo en un reactor de 7L [8]. Otro punto metodológico importante de abordar es la recuperación del etanol utilizado como solvente de extracción. El etanol potable es calificado por la FDA como una sustancia GRAS, lo que implica que puede utilizarse como solvente seguro en la industria alimentaria [115]. Además, gran parte del solvente utilizado (>90%) es recuperado mediante un proceso de destilación y puede ser reutilizado en futuras extracciones. Al final del proceso, el extracto obtenido fue secado por pulverización a baja temperatura mediante un secador por aspersion a escala piloto (Figura 5-C).



(A)



(B)



(C)

Figura 5: Equipamiento piloto utilizado en la extracción. (A) Planta de extracción piloto. (B) Molino semiindustrial; (C) Secador por aspersion a escala piloto.

Mediante la misma metodología descrita en la **Publicación 1**, se realizó la caracterización e identificación del extracto piloto utilizando LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS, y se analizaron los cambios y modificaciones del perfil fenólico comparándolos con lo observado en la extracción a escala analítica. El perfil fenólico obtenido a escala piloto (**Publicación 2**) efectivamente mostró diferencias en comparación con la extracción previa a escala de laboratorio **Publicación 1**. En el extracto a escala piloto solo se identificaron un total de 44 compuestos fenólicos, entre los cuáles destacó la presencia de ácidos fenólicos y aldehídos (17), estilbenos (15) y flavonoides (12). En lo que respecta a los ácidos fenólicos la mayor diferencia entre ambas extracciones fue la presencia de los aldehídos fenólicos hidroxibenzaldehído (m/z 121.0294) y el aldehído protocatecuico (m/z 137.0242) que fueron detectados solo en el extracto a escala piloto.

La presencia de estos compuestos fue relacionada con la degradación de la lignina provocada por efecto de la temperatura en el reactor piloto (80°C). Resultados similares fueron observados por Luque-Rodríguez et al. [59], en uno de los primeros estudios de extracción de sarmientos utilizando mezclas de agua y etanol a temperaturas entre 120 y 240 °C. Otro compuesto detectado en el extracto piloto y no en el extracto analítico fue el protocatecuato de etilo (m/z 181.0504) y su formación fue atribuida a la condensación del ácido protocatecuico con el etanol [114]. En el grupo de los flavonoides y particularmente en la detección de las proantocianidinas es donde se observaron las mayores diferencias. Aunque los monómeros de catequina (m/z 289.0715) y epicatequina (m/z 289.0714) fueron identificados, no se logró detectar procianidinas y prodelfinidinas oligoméricas que fueron extensamente detectadas e identificadas en el extracto a escala analítica (**Publicación 1**). Estos resultados podrían explicarse por las reacciones de epimerización, hidrólisis y oxidación/condensación de las proantocianidinas provocadas por la temperatura (80 °C) y el oxígeno presente en el reactor. Se ha probado que este tipo de compuestos pueden sufrir oligo/polimerización bajo tratamiento térmico [116]. Incluso en el extracto a escala piloto se detectó la presencia de un dímero de procianidina tipo A (m/z 575.1194), que no fue identificado en el extracto a escala de laboratorio. Otros estudios han observado que los dímeros de procianidina tipo B pueden convertirse en dímeros de tipo A por oxidación radical mediada por temperatura [117,118], por lo que se atribuyó la formación de este compuesto al entorno oxidativo del reactor de la planta piloto.

El perfil fenólico de los estilbenos en la extracción piloto también mostró algunas diferencias con el extraído a escala de laboratorio. Antes de hacer un análisis de ellos se debe tener en cuenta que los estilbenos oligoméricos son estructuras complejas que se generan por acoplamiento oxidativo de unidades de *trans*-resveratrol, isorhapontigenina, oxiresveratrol o piceatannol [31] y la ausencia o alto costos de patrones comerciales dificulta su identificación, por lo que sus estructuras definitivas debería ser elucidadas mediante técnicas de RMN. Sin embargo, el enfoque de espectrometría de masas permite realizar un análisis comparativo entre ambos extractos fenólicos. Teniendo en cuenta lo anterior, podemos mencionar que en el extracto piloto se identificó tentativamente la presencia de oxiresveratrol (m/z 243.0659) y un trímero estilbenoide (m/z 681.2123) que no fueron identificados en el extracto a escala de laboratorio. Por otro lado, en el extracto piloto, no se detectó la presencia de (*E*)-piceatannol (m/z 243.0659), viniferina diglicósido (m/z 777.2387), (*E*)- ω -viniferina (m/z

453.1335) y de un tetrámero estilbenoide (m/z 905.2576), que pueden haber sufrido degradación, oxidación o transformación durante el proceso de extracción piloto. Finalmente, tanto los taninos condensados (proantocianidinas) como los estilbenos oligoméricos son estructuras complejas que sufren diferentes reacciones, principalmente de oxidación y especialmente bajo las condiciones de extracción piloto. Por esta razón futuros estudios podrían centrarse en investigar en detalle los procesos oxidativos de estos compuestos.

En la **Publicación 2** también se desarrolló un análisis cuantitativo de los compuestos fenólicos individuales. Como se mencionó en el capítulo 1.2.3.4 (LTQ-Orbitrap) el modo de escaneo completo del equipo permite tanto la detección y cuantificación de analitos debido a su alta resolución y precisión de masas [40]. La cuantificación se determinó a partir de curvas de calibración de seis compuestos de referencia, por lo que cada concentración fue expresada en equivalentes del compuesto más similar. Por esta razón la etapa de cuantificación fue denominada como “semi-cuantificación” de manera de diferenciarla de un proceso de cuantificación con el patrón puro de cada compuesto. De todas maneras, solo se cuantificaron los compuestos que se encontraban dentro de su respectivo límite de cuantificación (LOQ). Teniendo en cuenta estas consideraciones, y de manera global, se observó que la clase de compuestos más abundantes fueron los estilbenos (8174 mg/kg), seguido de los ácidos fenólicos y aldehídos (4117 mg/kg) y finalmente de flavonoides (2492 mg/kg). A nivel individual destacó la alta concentración de (*E*)- ϵ -viniferina (3962 mg/kg), que fue cerca de tres veces superior a lo obtenido previamente bajo condiciones de laboratorio [22], demostrando la mayor capacidad de recuperación de la extracción piloto en este compuesto objetivo. También se observaron altos niveles de un heterodímero 1 parcialmente identificado como caraphenol B o C (1683 mg/kg). De manera similar a estos resultados, recientes estudios han concluido que los sarmientos de vid representan una fuente importante de estilbenoides poco comunes, los que incluyen dímeros, trímeros y tetrámeros [51]. Otros compuestos que se presentaron en una alta concentración fueron dos isómeros de astilbina que en su conjunto acumularon niveles de 1831 mg/kg. Estos resultados son relevantes debido a que un elevado consumo de dihidroflavonoles (o flavanonoles) como la astilbina se ha asociado inversamente con riesgo de muerte [119]. Además se ha demostrado que la astilbina pueden ser importante en el manejo de enfermedades asociadas con el sistema inmunológico, y destacan sus actividades antibacterinas, antioxidantes y hepatoprotectoras [120].

La capacidad antioxidante de los extractos de sarmientos producidos a escala piloto también fue determinada mediante los métodos ABTS^{•+} y ORAC-FL, y el resultado fue comparado con la extracción a escala de 7L realizada bajo las mismas condiciones experimentales de extracción [8]. Los resultados de la medición por ABTS^{•+} fueron muy similares entre el extracto piloto (2209 $\mu\text{mol TE/g}$) y el de escala a 7L (1954 $\mu\text{mol TE/g}$). Por su parte, el método ORAC-FL mostró una capacidad antioxidante ligeramente mayor en el extracto a escala de 7L (6895 $\mu\text{mol TE/g}$) con respecto al obtenido a escala piloto (4612 $\mu\text{mol TE/g}$).

En resumen, en la **Publicación 2**, se observaron diferencias entre el perfil fenólico del extracto a escala analítica y piloto. Estas diferencias estarían asociadas principalmente a procesos de oxidación térmica que sufren los compuestos fenólicos sobre todo el grupo de las proantocianidinas y estilbenos. Estos cambios se deben tener en cuenta a la hora de escalar y proyectar resultados de extracción desde el laboratorio a la industria. De todas formas, los sarmientos de vid extraídos a escala piloto mantienen un interesante perfil fenólico, con altos niveles de compuestos bioactivos, por lo que son un extracto prometedor para el desarrollo de nuevos productos en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente uno de los problemas de los compuestos fenólicos es su oxidación y degradación térmica. Por esta razón, se deben proteger de estos factores externos que limiten o impidan su degradación o modificación en el producto final. Una alternativa para mejorar la protección y estabilidad de estos compuestos es la tecnología de microencapsulación, que tiene como finalidad incorporar estos compuestos a una matriz protectora que preserve sus funcionalidades bioactivas hasta su consumo [76]. Además, este método es utilizado para mejorar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos y promover su transporte y mejorar su absorción en el cuerpo humano [78]. Por estas razones en la **Publicación 3** se planteó como objetivo encapsular los compuestos fenólicos presentes en el extracto de sarmientos producidos a escala de planta piloto (**Publicación 2**), mediante secado por aspersión. En la encapsulación se utilizó HP- β -CD y maltodextrina, se estudió la formación de complejos de inclusión, se determinó la eficiencia de encapsulación de los compuestos fenólicos y se evaluó la capacidad antioxidante del extracto encapsulado. A continuación, se discutirán algunos aspectos metodológicos y resultados relacionado a esta publicación que no necesariamente se encuentran mencionados en el artículo.

El proceso de encapsulación mediante secado por aspersión se realizó con objetivo de desarrollar un producto rico en compuestos fenólicos de alto valor agregado y con futuras aplicaciones en las industrias alimentaria y farmacéutica. Como se mencionó en el capítulo 1.4.1 (Secado por aspersión), esta técnica posee las ventajas de ser simple, rápida, flexible, con bajos costos de operación y ampliamente disponible y utilizada por la industrias alimentarias y farmacéuticas. Además, se ha establecido que permite obtener altas eficiencias de encapsulación, una gran estabilidad y fácil manejo del producto final [76,81]. Aunque el secado por aspersión es un método mediado por temperatura, es importante indicar que los compuestos bioactivos solo están sometidos a esta temperatura por unos pocos milisegundos [76]. De todas formas, las temperaturas del proceso (**Publicación 3**), se mantuvieron bajas con 130°C de temperatura de entrada y 71°C como temperatura de salida, lo que es superior a la temperatura de extracción (80°C). Estas variables además fueron evaluadas en un proyecto previo, y fueron protegidas mediante una patente de invención (Ver capítulo 8.2.2)

Para la encapsulación se utilizó HP- β -CD que posee una solubilidad mucho mayor que la β -CD [88]. Además, como se mencionó en el capítulo 1.4.2 (Encapsulamiento mediante Ciclodextrinas), la HP- β -CD es la menos tóxica de todas las ciclodextrinas y es bien tolerada en seres humanos [91,92]. También fue mencionado que la encapsulación de los compuestos fenólicos utilizando HP- β -CD implica la formación de un “complejo de inclusión”, que es el resultado de la interacción química entre compuestos fenólicos, y la HP- β -CD [94]. Por lo tanto, para reconocer estas interacciones diferentes métodos analíticos pueden ser empleados (Ver capítulo 1.4.3). En particular en la **Publicación 3** se utilizó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier equipado con una unidad de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), y como métodos complementarios se utilizó la microscopía electrónica de barrido (SEM) y LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. En este punto se debe considerar que ninguno de estos métodos es suficiente por sí mismo para estudiar la formación de los complejos de inclusión. Aunque cada uno aporta evidencia específica que permite confirmar la interacción entre los compuestos fenólicos y la HP- β -CD.

En relación con los resultados y el análisis de la **Publicación 3**, algunas consideraciones pueden ser discutidas. Se observó un alto rendimiento del proceso de secado (83%). Este alto rendimiento se atribuyó a una rápida formación de la costra de secado (compuestos activo y material de pared), lo que evita que el polvo se adhiera a la cámara de secado y contribuye a un mayor rendimiento del proceso [76,121]. Esto fue

un buen resultado debido a que un alto rendimiento mejora las proyecciones industriales para una producción final. Por otro lado, la morfología de las microcápsulas analizadas por SEM mostró estructuras esféricas y de superficie lisa, características que diferenciaron el extracto encapsulado del sin encapsular. Estos cambios morfológicos fueron la primera evidencia de formación de los complejos de inclusión, los que fueron apoyados luego por el análisis de FTIR-ATR y LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS.

El análisis de FTIR-ATR fue crucial para confirmar la interacción entre los compuestos fenólicos y la HP- β -CD. El FTIR es reconocido como un método útil para la detección de complejos de inclusión, que se revelan por cambios en los espectros FTIR, como la reducción, desaparición o desplazamiento de las bandas de absorción, debido a interacciones intermoleculares débiles [122]. Por esta razón, es muy importante analizar cada uno de los componentes por separado, (i) el extracto fenólico de sarmientos producido a escala piloto; (ii) la HP- β -CD; (iii) el complejo de inclusión y; (iv) una mezcla física que actúa como control. El espectro del complejo de inclusión mostró efectivamente que algunas bandas de absorción características de los compuestos fenólicos y de la HP- β -CD fueron desplazadas, reducidas o que desaparecieron. Entre los resultados más relevantes se encuentra el desplazamiento de bandas de absorción asociadas a la presencia de taninos y estilbenos. Además, las bandas de absorción relacionadas a los anillos fenólicos desaparecieron completamente lo que fue asociado a la formación del complejo de inclusión. Lo anterior, podría implicar que los anillos fenólicos estarían incrustados dentro de la cavidad de la H- β -CD. Este resultado fue relevante para poder confirmar la interacción química entre los compuestos fenólicos y la HP- β -CD, y nos proporcionó la evidencia más elevada de la formación de los complejos de inclusión. Además, como control el espectro de la mezcla física mostró una simple superposición de los componentes individuales (extracto piloto de sarmientos e HP- β -CD), sin mayor interacción entre ellos, diferenciándose de los resultados asociados al complejo de inclusión.

El perfil fenólico del extracto encapsulado también fue evaluado con el objetivo de tener un producto final lo más caracterizado posible en cuanto a su composición fenólica. Aunque el proceso de identificación se realizó siguiendo la misma metodología de la **Publicación 1 y 2**, las características del extracto encapsulado exigieron un paso adicional en la preparación de las muestras. Antes del análisis por LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS se realizó una hidrólisis ácida de las muestras encapsuladas utilizando ácido fórmico al 0.1% v/v. Este paso fue necesario para romper los complejos

de inclusión, liberar los compuestos fenólicos y lograr su posterior detección. Aunque esta es una hidrólisis ácida suave y en general no modificó substancialmente el perfil fenólico, no es posible descartar su influencia en los resultados de identificación. Teniendo en cuenta estas consideraciones 42 compuestos fueron identificados, incluidos estilbenos (17), flavonoides (15) y ácidos fenólicos (8). Además, se detectó un complejo entre β -CD y (*epi*)catequina, que confirmó la interacción entre compuestos fenólicos y las ciclodextrinas. Entre los compuestos fenólicos identificados 32 fueron detectados previamente en la extracción analítica (**Publicación 1**) y/o en la extracción a escala piloto (**Publicación 2**). Sin embargo, ocho compuestos fenólicos fueron detectados e identificados solo en el extracto encapsulado, entre ellos cinco flavonoides y tres estilbenos, por lo que a continuación se discutirá su detección.

La presencia de quercetina (*m/z* 301.0354), miricetina (*m/z* 317.0301) y un isómero de taxifolina (*m/z* 303.0503) podría estar relacionadas con la etapa de hidrólisis en la preparación de las muestras del extracto encapsulado, ya que derivados glicósidos de estos compuestos fueron identificados en las extracciones analítica y piloto. Por su parte la detección de dihidrokaempferol-*O*-rhamnoside (engeletina) (*m/z* 433.1139) y de la tetrahidroxiisoflavanona (*m/z* 287.0561) fueron más difícil de establecer. El dihidrokaempferol-*O*-rhamnoside fue detectado en tallos de uva [24], por lo que su presencia pudo estar relacionada a pequeñas trazas de tallos de uva en los 67 kg de sarmientos utilizados en la extracción piloto. La tetrahidroxiisoflavanona fue identificada provisionalmente y su presencia pudo estar relacionada con la hidrólisis de dihydrokaempferol-*O*-rhamnoside o del eriodictiol-*O*-glucósido. Otro resultado relevante fue la detección e identificación de tres estilbenos: maackin (*m/z* 485.1242), viniferol E (*m/z* 923.2680) y vinifenol A (*m/z* 679.1969), que no fueron detectados en el extracto analítico o piloto. Una posible explicación es que estos compuestos fueron hidrolizados o liberados a partir de estilbenos oligoméricos o poliméricos mayores. Otra explicación podría estar relacionada al uso de ciclodextrinas y la formación de complejos de inclusión, que ayudarían a concentrar algunos compuestos presentes en bajas concentraciones en el extracto piloto. De todas formas, tanto maackin A como vinifenol A, fueron previamente identificados y reportados por otros autores en muestras de tallo de uva [123]. Mientras que el viniferol E fue previamente detectado y cuantificado en muestras de sarmientos obtenidos mediante extracción con agua subcrítica [124]. Por lo que la presencia de todos estos compuestos, en subproductos de la industria vitivinícola, se encuentra respaldada por literatura.

La eficiencia de encapsulación (EE) fue otro resultado relevante en la **Publicación 3**. La EE depende de una gran variedad de factores, como la técnica de encapsulación utilizada, la solubilidad, el tamaño de la molécula huésped en relación con la cavidad del huésped, las concentraciones de las moléculas huésped, la constante de unión dentro del huésped y el huésped, etc. Incluso relaciones antagónicas de encapsulación o competencias de unión se pueden observar cuando se encapsulan más de un compuesto a la vez [125]. Es importante tener en cuenta que el extracto piloto de sarmientos es una compleja mezcla de varios compuestos (fenólicos y no fenólicos) y cada uno de ellos tiene diferentes propiedades físicas y químicas con distintas capacidades para formar interacciones y unirse con la HP- β -CD, por lo que es esperado observar una variada y específica EE para cada uno de los compuestos. Por esta razón y utilizando la misma metodología de cuantificación aplicada en la **Publicación 2**, se calculó la EE como una relación entre la concentración de los compuestos encapsulados y no encapsulados (Ver ecuación 4, **Publicación 3**). Como consideración metodológica es relevante indicar que solo se reportaron las EE para compuestos que cuantificables ($>LOQ$), en ambos extractos tanto encapsulado y no encapsulado. Por esta razón solo fue posible determinar la EE de solo 20 compuestos fenólicos de los 40 identificados en el extracto encapsulado.

Los resultados mostraron una EE global alta ($80.5 \pm 1.1\%$). A nivel de clases fenólicas las EE promedio ponderadas más altas fueron calculadas en el grupo de los flavonoides ($85.2 \pm 2.4\%$), seguida por los ácidos fenólicos y derivados ($81.5 \pm 0.7\%$) y en último lugar la de los estilbenos (78.6 ± 1.9). La menor EE de los estilbenos estuvo fuertemente influenciada por el bajo valor determinado para (*E*)-resveratrol (32.7 ± 2.8), aunque un valor similar (30-40 %) fue reportado para resveratrol encapsulado con nanoesponjas a base de ciclodextrina [126]. Si bien el resveratrol mostró esta baja EE otros dos estilbenos presentaron los valores más altos entre todos los compuestos estudiados. El restrytisol (A o B) (97.0 ± 0.6) fue el que presentó mayor EE seguido del heterodímero de estilbenoide (carafenol B/C) (96.8 ± 0.4). Estos resultados podrían estar relacionados con la interacción mediada por fuerzas de van der Waals y enlaces de hidrógeno de estos compuestos y la HP- β -CD. Lo anterior, debido a que ambos compuestos presentan 6 grupos hidroxilos en su estructura lo que facilitaría este tipo de interacciones. Por otro lado, el tetrámero de estilbenoide (m/z 905) mostró una menor pero esperada EE (65.8 ± 8.6), probablemente debido a su gran tamaño y superficie polar ($221 \text{ \AA}^2$). En lo que respecta al grupo de flavonoides se observaron valores más altos de EE en los derivados

glucósidos que en el eriodictyol, que fue la única aglicona reportada. Nuevamente esto se pudo relacionar a la mayor presencia de grupos disponibles para formar enlaces hidrógeno de los derivados glucósidos con respecto al eriodictyol. Finalmente, en el grupo de los ácidos fenólicos y derivados, el hidroxibenzaldehído (m/z 121) (95.8 ± 0.6) fue el compuesto con mayor EE, probablemente por ser el compuesto más pequeño dentro de este grupo. Por lo tanto, aunque numerosos mecanismos y variables influyen en la EE de compuestos fenólicos sobre todo en matrices complejas, en general, el extracto microencapsulado presenta una alta EE para muchos compuestos fenólicos de interés biológico.

La capacidad antioxidante del extracto encapsulado fue el último análisis de la **Publicación 3**. Esta capacidad antioxidante fue determinada por el método ORAC-FL, que es un método estandarizado y ampliamente utilizado por la industria como indicador comercial de actividad antioxidante para alimentos, suplementos y vitaminas [127]. Además, otros autores, han validado este método como el más adecuado y sensible para determinar la actividad antioxidante entre la HP- β -CD y el resveratrol [101]. También, nos proporcionó un análisis comparativo con el extracto a escala piloto. Aunque algunos estudios sugieren que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos encapsulados puede ser mejorada o incrementada [78], otros en cambio, muestran datos contradictorios e incluso se ha reportado que la encapsulación de los compuestos fenólicos disminuye o que no ve afectada su actividad antioxidante [105]. En nuestro caso, aunque una ligera mayor actividad antioxidante ORAC-FL fue determinada para el extracto encapsulado (5300 ± 472 $\mu\text{mol TE/g}$), este resultado no mostró diferencias estadísticamente significativas con la del extracto piloto sin encapsular (4612 ± 155 $\mu\text{mol TE/g}$), por lo que se puede concluir que la actividad antioxidante solo se preservó después de la encapsulación. Finalmente, en la **Publicación 3**, se encapsularon los compuestos fenólicos del extracto piloto de sarmientos y se confirmó la formación de complejos de inclusión con la HP- β -CD cumpliéndose el objetivo 3 de esta tesis doctoral.

De manera global y como resultados derivados de las **Publicaciones 1, 2 y 3**, se estudiaron los cambios en el perfil fenólico del extracto de sarmientos desde su producción hasta su encapsulación, por lo que desarrollamos un producto completamente caracterizado con relación a su perfil fenólico. Futuros estudios podrían centrarse en validar los efectos beneficiosos de este producto utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*, con la finalidad de transferir el proceso a la industria y el producto al mercado.

CONCLUSIONES / CONCLUSIONS



5 CONCLUSIONES.

Conclusiones Generales:

- El perfil fenólico de los extractos de sarmientos (*V. vinífera* L.) es modificado por los procesos de extracción a escala piloto y por la encapsulación de estos compuestos en ciclodextrinas.
- La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS) es una herramienta útil para estudiar los cambios en el perfil fenólico de los extractos de sarmientos sometidos a procesos de extracción y encapsulación.
- Se desarrolló un producto encapsulado rico en compuestos fenólicos de alto valor agregado y con futuras aplicaciones en las industrias alimentaria y farmacéutica.

Conclusiones Específicas:

- Mediante LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS se identificaron 75 compuestos fenólicos en extractos de sarmientos (*V. vinífera* L.) preparados a escala analítica, 17 de los cuáles fueron reportados por primera vez.
- El perfil fenólico del extracto de sarmientos (*V. vinífera* L.) es alterado por el proceso de extracción a escala piloto, principalmente por reacciones de oxidación, degradación o polimerización que sufren las proantocianidinas y los estilbenos.
- Los compuestos fenólicos presentes en el extracto de sarmientos producido a escala de planta piloto se encapsularon con éxito confirmándose la formación de complejos de inclusión.

6 CONCLUSIONS.

General Conclusions:

- The phenolic profile of grape canes (*V. vinifera* L.) extracts is altered by pilot-scale extraction procedures and by encapsulation of phenolic compounds in cyclodextrins.
- Liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS) is a useful tool to study the changes in the phenolic profile of grape canes extracts subjected to extraction and encapsulation processes.
- An encapsulated product rich in phenolic compounds has been developed with high added value that could find future applications in the food and pharmaceutical industries.

Specific Conclusions:

- Using LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS, 75 phenolic compounds were identified in extracts of grape canes (*V. vinifera* L.) prepared at an analytical scale, 17 of which were reported for the first time.
- The phenolic profile of grape canes (*V. vinifera* L.) extract is altered by the pilot-scale extraction process, mainly by oxidation, degradation, or polymerization reactions of proanthocyanidins and stilbenes.
- The phenolic compounds present in the grape canes pilot-plant extract were successfully encapsulated, confirming the formation of inclusion complexes.

REFERENCIAS



7 REFERENCIAS.

1. OIV State of the World Vitivinicultural Sector in 2020 Available online: <http://www.oiv.int/js/lib/pdfjs/web/viewer.html?file=/public/medias/7298/oiv-state-of-the-vitivinicultural-sector-in-2019.pdf> (Accessed on June 16, 2020).
2. Dávila, I.; Robles, E.; Egüés, I.; Labidi, J.; Gullón, P. The Biorefinery Concept for the Industrial Valorization of Grape Processing By-Products. In *Handbook of Coffee Processing By-Products: Sustainable Applications*; Elsevier Inc., 2017; pp. 63–92 ISBN 9780128112915.
3. Hellman, E.W. Grapevine Structure and Function. In *Oregon Viticulture*; 2003; pp. 45–95 ISBN 0870715542 9780870715549.
4. Velázquez-Martí, B.; Fernández-González, E.; López-Cortés, I.; Salazar-Hernández, D.M. Quantification of the residual biomass obtained from pruning of vineyards in Mediterranean area. *Biomass and Bioenergy* **2011**, 35, 3453–3464, doi:10.1016/j.biombioe.2011.04.009.
5. Troilo, M.; Difonzo, G.; Paradiso, V.M.; Summo, C. Bioactive Compounds from Vine Shoots , Grape Stalks , and Wine Lees : Their Potential Use in Agro-Food Chains. *Foods* **2021**, 1–16, doi:10.3390/foods10020342.
6. Jiménez, L.; Angulo, V.; Ramos, E.; De La Torre, M.J.; Ferrer, J.L. Comparison of various pulping processes for producing pulp from vine shoots. *Ind. Crops Prod.* **2006**, 23, 122–130, doi:10.1016/j.indcrop.2005.05.001.
7. Mendívil, M.A.; Muñoz, P.; Morales, M.P.; Juárez, M.C.; García-Escudero, E. Chemical characterization of pruned vine shoots from la Rioja (Spain) for obtaining solid bio-fuels. *J. Renew. Sustain. Energy* **2013**, 5, doi:10.1063/1.4808043.
8. Riquelme, S.; Sáez, V.; Escobar, D.; Vergara, C.; Fuentealba, C.; Bustamante, L.; von Baer, D.; Jara, P.; Lamperti, L.; Mardones, C. Bench-scale extraction of stilbenoids and other phenolics from stored grape canes (*Vitis vinifera*): Optimization process, chemical characterization, and potential protection against oxidative damage. *J. Chil. Chem. Soc.* **2019**, 64, 4414–4420, doi:10.4067/S0717-97072019000204414.
9. Çetin, E.S.; Altinöz, D.; Tarçan, E.; Göktürk Baydar, N. Chemical composition of grape canes. *Ind. Crops Prod.* **2011**, 34, 994–998,

- doi:10.1016/j.indcrop.2011.03.004.
10. Dávila, I.; Gordobil, O.; Labidi, J.; Gullón, P. Assessment of suitability of vine shoots for hemicellulosic oligosaccharides production through aqueous processing. *Bioresour. Technol.* **2016**, *211*, 636–644, doi:10.1016/j.biortech.2016.03.153.
11. Maroun, R.G.; Rajha, H.N.; Vorobiev, E.; Louka, N. Emerging Technologies for the Recovery of Valuable Compounds From Grape Processing By-Products. In *Handbook of Grape Processing By-Products: Sustainable Solutions*; Elsevier Inc., 2017; pp. 155–181 ISBN 9780128098714.
12. Max, B.; Salgado, J.M.; Cortés, S.; Domínguez, J.M. Extraction of phenolic acids by alkaline hydrolysis from the solid residue obtained after prehydrolysis of trimming vine shoots. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1909–1917, doi:10.1021/jf903441d.
13. Briones, R.; Torres, L.; Saravia, Y.; Serrano, L.; Labidi, J. Liquefied agricultural residues for film elaboration. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *78*, 19–28, doi:10.1016/j.indcrop.2015.10.021.
14. Sánchez-Gómez, R.; Alonso, G.L.; Salinas, M.R.; Zalacain, A. Reuse of Vine-Shoots Wastes for Agricultural Purposes. In *Handbook of Grape Processing By-Products: Sustainable Solutions*; Elsevier Inc., 2017; pp. 79–104 ISBN 9780128098714.
15. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-casassus, C.; Pouysøgu, L. Natural Products Plant Polyphenols : Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis **. *Angew. Chem., Int. Ed* **2011**, 586–621, doi:10.1002/anie.201000044.
16. Escobar-Avello, D.; Lozano-Castellón, J.; Mardones, C.; Pérez, A.J.; Sáez, V.; Riquelme, S.; Von Baer, D.; Vallverdú-Queralt, A. Phenolic profile of grape canes: Novel compounds identified by LC-ESI-LTQ-orbitrap-MS. *Molecules* **2019**, *24*, doi:10.3390/molecules24203763.
17. Sáez, V.; Pastene, E.; Vergara, C.; Mardones, C.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Gómez-Alonso, S.; Gómez, M.V.; Theoduloz, C.; Riquelme, S.; von Baer, D. Oligostilbenoids in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir grape cane extract: Isolation, characterization, *in vitro* antioxidant capacity and anti-proliferative effect on cancer cells. *Food Chem.* **2018**, *265*, 101–110, doi:10.1016/j.foodchem.2018.05.050.
18. Montero, L.; Sáez, V.; von Baer, D.; Cifuentes, A.; Herrero, M. Profiling of *Vitis*

- vinifera* L. canes (poly)phenolic compounds using comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2018**, 1536, 205–215, doi:10.1016/j.chroma.2017.06.013.
19. Stalikas, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 3268–3295, doi:10.1002/jssc.200700261.
20. Panche, A.N.; Diwan, A.D.; Chandra, S.R. Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, 5, doi:10.1017/jns.2016.41.
21. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants Redox Signal.* **2013**, 18, 1818–1892, doi:10.1089/ars.2012.4581.
22. Sáez, V.; Gayoso, C.; Riquelme, S.; Pérez, J.; Vergara, C.; Mardones, C.; von Baer, D. C18 core-shell column with in-series absorbance and fluorescence detection for simultaneous monitoring of changes in stilbenoid and proanthocyanidin concentrations during grape cane storage. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2018**, 1074–1075, 70–78, doi:10.1016/j.jchromb.2017.12.028.
23. Cebrián, C.; Sánchez-Gómez, R.; Salinas, M.R.; Alonso, G.L.; Zalacain, A. Effect of post-pruning vine-shoots storage on the evolution of high-value compounds. *Ind. Crops Prod.* **2017**, 109, 730–736, doi:10.1016/j.indcrop.2017.09.037.
24. Goufo, P.; Singh, R.K.; Cortez, I. A Reference List of Phenolic Compounds (Including Stilbenes) in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Roots, Woods, Canes, Stems, and Leaves. **2020**, 9–13, doi:10.3390/antiox9050398.
25. Tsimogiannis, D.; Oreopoulou, V. Classification of Phenolic Compounds in Plants. In *Polyphenols in Plants*; Elsevier Inc., 2019; pp. 263–284 ISBN 9780128137680.
26. Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2010**, 2, 1231–1246, doi:10.3390/nu2121231.
27. Rusjan, D.; Mikulic-Petkovsek, M. Phenolic responses in 1-year-old canes of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay induced by grapevine yellows (Bois noir). *Aust. J. Grape Wine Res.* **2015**, 21, 123–134, doi:10.1111/ajgw.12106.
28. Belščak-Cvitanović, A.; Durgo, K.; Huđek, A.; Bačun-Družina, V.; Komes, D. Overview of polyphenols and their properties. In *Polyphenols: Properties,*

- Recovery, and Applications*; 2018; pp. 3–44 ISBN 9780128135723.
29. Kumar, N.; Goel, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol. Reports* **2019**, *24*, e00370, doi:10.1016/j.btre.2019.e00370.
 30. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jime, L. Polyphenols: food sources and bioavailability 1,2. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747, doi:https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727.
 31. Rivière, C.; Pawlus, A.D.; Mérillon, J.-M. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1317, doi:10.1039/c2np20049j.
 32. Zwingelstein, M.; Draye, M.; Besombes, J.L.; Piot, C.; Chatel, G. Viticultural wood waste as a source of polyphenols of interest: Opportunities and perspectives through conventional and emerging extraction methods. *Waste Manag.* **2020**, *102*, 782–794, doi:10.1016/j.wasman.2019.11.034.
 33. Lamuela-Raventós, R.M.; Vallverdú-Queralt, A.; Jáuregui, O.; Martínez-Huélamo, M.; Quifer-Rada, P. Improved Characterization of Polyphenols Using Liquid Chromatography. In *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*; Elsevier, 2014; pp. 261–292 ISBN 9780123979346.
 34. De Villiers, A.; Venter, P.; Pasch, H. Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1430*, 16–78, doi:10.1016/j.chroma.2015.11.077.
 35. Pyrzynska, K.; Sentkowska, A. Chromatographic Analysis of Polyphenols. In *Polyphenols in Plants*; Elsevier Inc., 2019; pp. 353–364 ISBN 9780128137680.
 36. Dorosh, O.; Moreira, M.M.; Rodrigues, F.; Peixoto, A.F.; Freire, C.; Morais, S.; Delerue-Matos, C. Vine-canes valorisation: Ultrasound-assisted extraction from lab to pilot scale. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/molecules25071739.
 37. Plaza, M.; Domínguez-Rodríguez, G.; Castro-Puyana, M.; Marina, M.L. Polyphenols analysis and related challenges. In *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*; Elsevier, 2018; pp. 177–232 ISBN 9780128135723.
 38. Eliuk, S.; Makarov, A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2015**, *8*, 61–80, doi:10.1146/annurev-anchem-071114-040325.
 39. Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1156–1162,

- doi:10.1021/ac991131p.
40. Yan, X. ting; Zhang, Y.; Zhou, Y.; Li, G. hui; Feng, X. song Technical Overview of Orbitrap High Resolution Mass Spectrometry and Its Application to the Detection of Small Molecules in Food (Update Since 2012). *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2020**, *0*, 1–34, doi:10.1080/10408347.2020.1815168.
 41. Olsen, J. V.; Schwartz, J.C.; Griep-Raming, J.; Nielsen, M.L.; Damoc, E.; Denisov, E.; Lange, O.; Remes, P.; Taylor, D.; Splendore, M.; et al. A dual pressure linear ion trap orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 2759–2769, doi:10.1074/mcp.M900375-MCP200.
 42. Vallverdú-Queralt, A.; Jáuregui, O.; Medina-Remón, A.; Andrés-Lacueva, C.; Lamuela-Raventós, R.M. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2986–2992, doi:10.1002/rcm.4731.
 43. Vallverdú-Queralt, A.; Alvarenga, J.F.R. De; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Bioactive compounds present in the Mediterranean sofrito. *Food Chem.* **2013**, *141*, 3366–3372, doi:10.1016/j.foodchem.2013.06.032.
 44. Quifer-Rada, P.; Vallverdú-Queralt, A.; Martínez-Huélamo, M.; Chiva-Blanch, G.; Jáuregui, O.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chem.* **2015**, *169*, 336–343, doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.154.
 45. Regueiro, J.; Sánchez-González, C.; Vallverdú-Queralt, A.; Simal-Gándara, J.; Lamuela-Raventós, R.; Izquierdo-Pulido, M. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. *Food Chem.* **2014**, *152*, 340–348, doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.158.
 46. Vallverdú-Queralt, A.; Regueiro, J.; Martínez-Huélamo, M.; Rinaldi Alvarenga, J.F.; Leal, L.N.; Lamuela-Raventós, R.M. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem.* **2014**, *154*, 299–307, doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.106.
 47. Escobar-Avello, D.; Olmo-Cunillera, A.; Lozano-Castellón, J.; Marhuenda-

- Muñoz, M.; Vallverdú-Queralt, A. A Targeted Approach by High Resolution Mass Spectrometry to Reveal New Compounds in Raisins. *Molecules* **2020**, *25*, 1281, doi:10.3390/molecules25061281.
48. Aliaño-gonzález, M.J.; Richard, T.; Cantos-villar, E. Grapevine cane extracts: Raw plant material, extraction methods, quantification, and applications. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1–33, doi:10.3390/biom10081195.
49. Guerrero, R.F.; Biais, B.; Richard, T.; Puertas, B.; Waffo-Teguo, P.; Merillon, J.M.; Cantos-Villar, E. Grapevine cane's waste is a source of bioactive stilbenes. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *94*, 884–892, doi:10.1016/j.indcrop.2016.09.055.
50. Lambert, C.; Richard, T.; Renouf, E.; Bisson, J.; Waffo-Tégou, P.; Bordenave, L.; Ollat, N.; Mérillon, J.M.; Cluzet, S. Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11392–11399, doi:10.1021/jf403716y.
51. Billet, K.; Unlubayir, M.; Munsch, T.; Malinowska, M.A.; De Bernonville, T.D.; Oudin, A.; Courdavault, V.; Besseau, S.; Giglioli-Guivarc'h, N.; Lanoue, A. Postharvest Treatment of Wood Biomass from a Large Collection of European Grape Varieties: Impact on the Selection of Polyphenol-Rich Byproducts. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2021**, *9*, 3509–3517, doi:10.1021/acssuschemeng.0c07875.
52. Vergara, C.; Von Baer, D.; Mardones, C.; Wilkens, A.; Wernekinck, K.; Damm, A.; Macke, S.; Gorena, T.; Winterhalter, P. Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 929–933, doi:10.1021/jf204482c.
53. Gorena, T.; Saez, V.; Mardones, C.; Vergara, C.; Winterhalter, P.; Von Baer, D. Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chem.* **2014**, *155*, 256–263, doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.073.
54. Billet, K.; Houillé, B.; Besseau, S.; Mélin, C.; Oudin, A.; Papon, N.; Courdavault, V.; Clastre, M.; Giglioli-Guivarc'h, N.; Lanoue, A. Mechanical stress rapidly induces E-resveratrol and E-piceatannol biosynthesis in grape canes stored as a freshly-pruned byproduct. *Food Chem.* **2018**, *240*, 1022–1027, doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.105.
55. Houillé, B.; Besseau, S.; Courdavault, V.; Oudin, A.; Glévarec, G.; Delanoue, G.; Guérin, L.; Simkin, A.J.; Papon, N.; Clastre, M.; et al. Biosynthetic Origin of E-Resveratrol Accumulation in Grape Canes during Postharvest Storage. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 1631–1638, doi:10.1021/jf505316a.

56. Ewald, P.; Delker, U.; Winterhalter, P. Quantification of stilbenoids in grapevine canes and grape cluster stems with a focus on long-term storage effects on stilbenoid concentration in grapevine canes. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 326–331, doi:10.1016/j.foodres.2017.08.003.
57. Mardones, C.; Von Baer, D.; Vergara, C.; Escobar-Avello, D.; Fuentealba, C.; Riquelme, S. Un procedimiento para aumentar el contenido de estilbenos, esencialmente resveratrol, en sarmientos provenientes de las podas de *Vitis vinífera* 2014, CL2014003417A1.
58. Soral, I.; Vrchotova, N.; Triska, J.; Balík, J. Changes in the grape cane stilbene content under various conditions of storage. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *7*, 19584–19590, doi:10.1021/acssuschemeng.9b04681.
59. Luque-Rodríguez, J.M.; Pérez-Juan, P.; Luque De Castro, M.D. Extraction of polyphenols from vine shoots of *Vitis vinifera* by superheated ethanol-water mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8775–8781, doi:10.1021/jf061855j.
60. Rayne, S.; Karacabey, E.; Mazza, G. Grape cane waste as a source of trans-resveratrol and trans-viniferin: High-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *Ind. Crops Prod.* **2008**, *27*, 335–340, doi:10.1016/j.indcrop.2007.11.009.
61. Karacabey, E.; Mazza, G. Optimization of solid-liquid extraction of resveratrol and other phenolic compounds from milled grape canes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6318–6325, doi:10.1021/jf800687b.
62. Delgado-Torre, M.P.; Ferreira-Vera, C.; Priego-Capote, F.; Pérez-Juan, P.M.; Luque De Castro, M.D. Comparison of accelerated methods for the extraction of phenolic compounds from different vine-shoot cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 3051–3060, doi:10.1021/jf205078k.
63. Sánchez-Gómez, R.; Zalacain, A.; Alonso, G.L.; Salinas, M.R. Vine-shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: Phenolic, volatile, and mineral compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 10861–10872, doi:10.1021/jf503929v.
64. Soral, I.; Vrchotová, N.; Triska, J.; Balík, J.; Horník, Š.; Cuřínová, P.; Sýkora, J. Various extraction methods for obtaining stilbenes from grape cane of *Vitis vinifera* L. *Molecules* **2015**, *20*, 6093–6112, doi:10.3390/molecules20046093.
65. Piñeiro, Z.; Marrufo-Curtido, A.; Vela, C.; Palma, M. Microwave-assisted extraction of stilbenes from woody vine material. *Food Bioprod. Process.* **2017**,

- 103, 18–26, doi:10.1016/j.fbp.2017.02.006.
66. Moreira, M.M.; Barroso, M.F.; Porto, J.V.; Ramalhosa, M.J.; Švarc-Gajić, J.; Estevinho, L.; Morais, S.; Delerue-Matos, C. Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds. *Sci. Total Environ.* **2018**, *634*, 831–842, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.035.
 67. Jesus, M.S.; Genisheva, Z.; Romaní, A.; Pereira, R.N.; Teixeira, J.A.; Domingues, L. Bioactive compounds recovery optimization from vine pruning residues using conventional heating and microwave-assisted extraction methods. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *132*, 99–110, doi:10.1016/j.indcrop.2019.01.070.
 68. Jesus, M.S.; Romaní, A.; Genisheva, Z.; Teixeira, J.A.; Domingues, L. Integral valorization of vine pruning residue by sequential autohydrolysis stages. *J. Clean. Prod.* **2017**, *168*, 74–86, doi:10.1016/j.jclepro.2017.08.230.
 69. Gullón, B.; Eibes, G.; Da, I.; Vila, C.; Labidi, J.; Gullón, P. Valorization of Vine Shoots Based on the Autohydrolysis Fractionation Optimized by a Kinetic Approach. **2017**, doi:10.1021/acs.iecr.7b02833.
 70. Gullón, B.; Eibes, G.; Moreira, M.T.; Dávila, I.; Labidi, J.; Gullón, P. Antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from the refining of autohydrolysis liquors of vine shoots. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *107*, 105–113, doi:10.1016/j.indcrop.2017.05.034.
 71. Zachová, Z.; Tríska, J.; Vrchotová, N.; Balík, J.; Sajfrtová, M.; Sovová, H. Combining high-pressure methods for extraction of stilbenes from grape cane. *J. Supercrit. Fluids* **2018**, *142*, 38–44, doi:10.1016/j.supflu.2018.05.021.
 72. Rajha, H.N.; Boussetta, N.; Louka, N.; Maroun, R.G.; Vorobiev, E. A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Res. Int.* **2014**, *65*, 462–468, doi:10.1016/j.foodres.2014.04.024.
 73. Rajha, H.N.; Boussetta, N.; Louka, N.; Maroun, R.G.; Vorobiev, E. Effect of alternative physical pretreatments (pulsed electric field, high voltage electrical discharges and ultrasound) on the dead-end ultrafiltration of vine-shoot extracts. *Sep. Purif. Technol.* **2015**, *146*, 243–251, doi:10.1016/j.seppur.2015.03.058.
 74. Rajha, H.N.; Boussetta, N.; Louka, N.; Maroun, R.G.; Vorobiev, E. Electrical, mechanical, and chemical effects of high-voltage electrical discharges on the polyphenol extraction from vine shoots. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2015**, *31*, 60–66, doi:10.1016/j.ifset.2015.07.006.

75. Jesus, M.S.; Ballesteros, L.F.; Pereira, R.N.; Genisheva, Z.; Carvalho, A.C.; Pereira-Wilson, C.; Teixeira, J.A.; Domingues, L. Ohmic heating polyphenolic extracts from vine pruning residue with enhanced biological activity. *Food Chem.* **2020**, *316*, doi:10.1016/j.foodchem.2020.126298.
76. Marisa Ribeiro, A.; Estevinho, B.N.; Rocha, F. Microencapsulation of polyphenols - The specific case of the microencapsulation of *Sambucus Nigra* L. extracts - A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *105*, 454–467, doi:10.1016/j.tifs.2019.03.011.
77. Davidov-Pardo, G.; McClements, D.J. Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *38*, 88–103, doi:10.1016/j.tifs.2014.05.003.
78. Pinho, E.; Grootveld, M.; Soares, G.; Henriques, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *101*, 121–135, doi:10.1016/j.carbpol.2013.08.078.
79. Fang, Z.; Bhandari, B. Encapsulation of polyphenols - A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2010**, *21*, 510–523, doi:10.1016/j.tifs.2010.08.003.
80. Đorđević, V.; Balanč, B.; Belščak-Cvitanović, A.; Lević, S.; Trifković, K.; Kalušević, A.; Kostić, I.; Komes, D.; Bugarski, B.; Nedović, V. Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Eng. Rev.* **2014**, *7*, 452–490, doi:10.1007/s12393-014-9106-7.
81. Ozkan, G.; Franco, P.; De Marco, I.; Xiao, J.; Capanoglu, E. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chem.* **2019**, *272*, 494–506, doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.205.
82. Laza-Knoerr, A.L.; Gref, R.; Couvreur, P. Cyclodextrins for drug delivery. *J. Drug Target.* **2010**, *18*, 645–656, doi:10.3109/10611861003622552.
83. Lachowicz, M.; Stańczak, A.; Kołodziejczyk, M. Characteristic of Cyclodextrins: Their Role and Use in the Pharmaceutical Technology. *Curr. Drug Targets* **2020**, *21*, 1495–1510, doi:10.2174/1389450121666200615150039.
84. Loftsson, T.; Duchêne, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* **2007**, *329*, 1–11, doi:10.1016/j.ijpharm.2006.10.044.
85. Freudenberg, K.; Cramer, F. Die Konstitution der Schardinger-Dextrine. *Aus d. &em. Inst. d. Univ. Heidelb.* **1949**, 17–19.
86. Cramer, F. *Einschlussverbindungen*; 1954; ISBN 9783540017875.

87. Cai, R.; Yuan, Y.; Cui, L.; Wang, Z.; Yue, T. Cyclodextrin-assisted extraction of phenolic compounds: Current research and future prospects. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *79*, 19–27, doi:10.1016/j.tifs.2018.06.015.
88. Arora, D.; Saneja, A.; Jaglan, S. Cyclodextrin-based delivery systems for dietary pharmaceuticals. *Environ. Chem. Lett.* **2019**, *17*, 1263–1270, doi:10.1007/s10311-019-00878-w.
89. Mortensen, A.; Aguilar, F.; Crebelli, R.; Di Domenico, A.; Dusemund, B.; Frutos, M.J.; Galtier, P.; Gott, D.; Gundert-Remy, U.; Leblanc, J.; et al. Re-evaluation of β -cyclodextrin (E 459) as a food additive. *EFSA J.* **2016**, *14*, doi:10.2903/j.efsa.2016.4628.
90. Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J.C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocoll.* **2009**, *23*, 1631–1640, doi:10.1016/j.foodhyd.2009.01.001.
91. Gould, S.; Scott, R.C. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1451–1459, doi:10.1016/j.fct.2005.03.007.
92. D’Aria, F.; Pagano, B.; Giancola, C. Thermodynamic properties of hydroxypropyl- β -cyclodextrin/guest interaction: a survey of recent studies. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2021**, doi:10.1007/s10973-021-10958-1.
93. Braga, S.S. Cyclodextrins: Emerging medicines of the new millennium. *Biomolecules* **2019**, *9*, doi:10.3390/biom9120801.
94. Liu, L.; Guo, Q.X. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. *J. Incl. Phenom.* **2002**, *42*, 1–14, doi:10.1023/A:1014520830813.
95. Crini, G. Review: A history of cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10940–10975, doi:10.1021/cr500081p.
96. Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743–1753, doi:10.1021/cr970022c.
97. Astray, G.; Mejuto, J.C.; Simal-Gandara, J. Latest developments in the application of cyclodextrin host-guest complexes in beverage technology processes. *Food Hydrocoll.* **2020**, *106*, 105882, doi:10.1016/j.foodhyd.2020.105882.
98. Deng, J.; Yang, H.; Capanoglu, E.; Cao, H.; Xiao, J. Technological aspects and stability of polyphenols. In *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*; Elsevier Inc., 2018; pp. 295–323 ISBN 9780128135723.

99. dos Santos Lima, B.; Shanmugam, S.; de Souza Siqueira Quintans, J.; Quintans-Júnior, L.J.; de Souza Araújo, A.A. Inclusion complex with cyclodextrins enhances the bioavailability of flavonoid compounds: a systematic review. *Phytochem. Rev.* **2019**, *18*, 1337–1359, doi:10.1007/s11101-019-09650-y.
100. Lucas-Abellán, C.; Mercader-Ros, M.T.; Zafrilla, M.P.; Fortea, M.I.; Gabaldón, J.A.; Núñez-Delicado, E. ORAC-fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2254–2259, doi:10.1021/jf0731088.
101. Lucas-Abellán, C.; Mercader-Ros, M.T.; Zafrilla, M.P.; Gabaldón, J.A.; Núñez-Delicado, E. Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 1255–1260, doi:10.1016/j.fct.2011.03.004.
102. Taofiq, O.; Heleno, S.A.; Calhelha, R.C.; Fernandes, I.P.; Alves, M.J.; Barros, L.; González-Paramás, A.M.; Ferreira, I.C.F.R.; Barreiro, M.F. Phenolic acids, cinnamic acid, and ergosterol as cosmeceutical ingredients: Stabilization by microencapsulation to ensure sustained bioactivity. *Microchem. J.* **2019**, *147*, 469–477, doi:10.1016/j.microc.2019.03.059.
103. Zeng, Z.; Fang, Y.; Ji, H. Side chain influencing the interaction between β -cyclodextrin and vanillin. *Flavour Fragr. J.* **2012**, *27*, 378–385, doi:10.1002/ffj.3115.
104. da Rosa, C.G.; Borges, C.D.; Zambiasi, R.C.; Nunes, M.R.; Benvenutti, E.V.; Luz, S.R. da; D'Avila, R.F.; Rutz, J.K. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *46*, 138–146, doi:10.1016/j.indcrop.2012.12.053.
105. López-Nicolás, J.M.; Rodríguez-Bonilla, P.; García-Carmona, F. Cyclodextrins and Antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**, *54*, 251–276, doi:10.1080/10408398.2011.582544.
106. Matencio, A.; García-Carmona, F.; López-Nicolás, J.M. Encapsulation of piceatannol, a naturally occurring hydroxylated analogue of resveratrol, by natural and modified cyclodextrins. *Food Funct.* **2016**, *7*, 2367–2373, doi:10.1039/c6fo00557h.
107. Lavelli, V.; Gallotti, F.; Pedrali, D. Application of compounds from grape processing by-products: Formulation of dietary fiber and encapsulated bioactive compounds. In *Food Waste Recovery*; INC, 2021; pp. 355–366 ISBN

- 9780128205631.
108. Rajha, H.N.; Chacar, S.; Charbel, A.; Vorobiev, E.; Louka, N.; Maroun, R.G.; Afif, C.; Vorobiev, E.; Louka, N.; Maroun, R.G. β -Cyclodextrin-Assisted Extraction of Polyphenols from Vine Shoot Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 3387–3393, doi:10.1021/acs.jafc.5b00672.
 109. Heras, R.M. Las; Quifer-Rada, P.; Andrés, A.; Lamuela-Raventós, R. Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *J. Funct. Foods* **2016**, *23*, 370–377, doi:10.1016/j.jff.2016.02.048.
 110. Xiao, J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57*, 1874–1905, doi:10.1080/10408398.2015.1032400.
 111. Teixeira, N.; Azevedo, J.; Mateus, N.; De Freitas, V. Proanthocyanidin screening by LC-ESI-MS of Portuguese red wines made with teinturier grapes. *Food Chem.* **2016**, *190*, 300–307, doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.065.
 112. Teixeira, N.; Mateus, N.; de Freitas, V. Updating the research on prodelphinidins from dietary sources. *Food Res. Int.* **2016**, *85*, 170–181, doi:10.1016/j.foodres.2016.04.026.
 113. Zwingelstein, M.; Draye, M.; Besombes, J.L.; Piot, C.; Chatel, G. Trans-Resveratrol and trans- ϵ -Viniferin in Grape Canes and Stocks Originating from Savoie Mont Blanc Vineyard Region: Pre-extraction Parameters for Improved Recovery. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7*, 8310–8316, doi:10.1021/acssuschemeng.8b06723.
 114. Escobar-Avello, D.; Mardones, C.; Sáez, V.; Riquelme, S.; von Baer, D.; Lamuela-Raventós, R.M.; Vallverdú-Queralt, A. Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from grape canes: Comprehensive characterization by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *Food Res. Int.* **2021**, *143*, 110265, doi:10.1016/j.foodres.2021.110265.
 115. Rutar, J.M.; Cillero-pastor, B.; Mohren, R.; Ulrih, N.P.; Ogrinc, N.; Jamnik, P. Insight into the Antioxidant Effect of Fermented and Non-Fermented Spirulina Water and Ethanol Extracts at the Proteome Level Using a Yeast Cell Model. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1366.
 116. Fan, F.Y.; Shi, M.; Nie, Y.; Zhao, Y.; Ye, J.H.; Liang, Y.R. Differential behaviors of tea catechins under thermal processing: Formation of non-enzymatic

- oligomers. *Food Chem.* **2016**, *196*, 347–354, doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.056.
117. Chen, L.; Yuan, P.; Chen, K.; Jia, Q.; Li, Y. Oxidative conversion of B- to A-type procyanidin trimer: Evidence for quinone methide mechanism. *Food Chem.* **2014**, *154*, 315–322, doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.018.
118. Kondo, K.; Kurihara, M.; Fukuhara, K.; Tanaka, T.; Suzuki, T.; Miyata, N.; Toyoda, M. Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 485–488, doi:https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)02097-3.
119. Tresserra-Rimbau, A.; Rimm, E.B.; Medina-Remón, A.; Martínez-González, M.A.; López-Sabater, M.C.; Covas, M.I.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Gómez-Gracia, E.; Lapetra, J.; et al. Polyphenol intake and mortality risk: A re-analysis of the PREDIMED trial. *BMC Med.* **2014**, *12*, 1–11, doi:10.1186/1741-7015-12-77.
120. Sharma, A.; Gupta, S.; Chauhan, S.; Nair, A.; Sharma, P. Astilbin: a Promising Unexplored Compound With Multidimensional Medicinal and Health Benefits. *Pharmacol. Res.* **2020**, *158*, 104894, doi:10.1016/j.phrs.2020.104894.
121. Urzúa, C.; González, E.; Dueik, V.; Bouchon, P.; Giménez, B.; Robert, P. Olive leaves extract encapsulated by spray-drying in vacuum fried starch–gluten doughs. *Food Bioprod. Process.* **2017**, *106*, 171–180, doi:10.1016/j.fbp.2017.10.001.
122. Franco, P.; De Marco, I. Preparation of non-steroidal anti-inflammatory drug/ β -cyclodextrin inclusion complexes by supercritical antisolvent process. *J. CO2 Util.* **2021**, *44*, doi:10.1016/j.jcou.2020.101397.
123. Papastamoulis, Y.; Richard, T.; Nassra, M.; Badoc, A.; Krisa, phanie; Harakat, D.; Monti, J.-P.; Me, J.-M.; Waffo-Teguo, P. Viniphenol A, a Complex Resveratrol Hexamer from *Vitis vinifera* Stalks: Structural Elucidation and Protective Effects against Amyloid- β -Induced Toxicity in PC12 Cells. *J. Nat. Prod* **2014**, *77*, 46, doi:10.1021/np4005294.
124. Gabaston, J.; Leborgne, C.; Valls, J.; Renouf, E.; Richard, T.; Waffo-Teguo, P.; Mérillon, J.M. Subcritical water extraction of stilbenes from grapevine by-products: A new green chemistry approach. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *126*, 272–279, doi:10.1016/j.indcrop.2018.10.020.

125. Olga, G.; Styliani, C.; Ioannis, R.G. Coencapsulation of Ferulic and Gallic acid in hp-b-cyclodextrin. *Food Chem.* **2015**, *185*, 33–40, doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.058.
126. Ansari, K.A.; Vavia, P.R.; Trotta, F.; Cavalli, R. Cyclodextrin-based nanosponges for delivery of resveratrol: *In vitro* characterisation, stability, cytotoxicity and permeation study. *AAPS PharmSciTech* **2011**, *12*, 279–286, doi:10.1208/s12249-011-9584-3.
127. Jaffe, R.; Mani, J. Polyphenolics evoke healing responses: Clinical evidence and role of predictive biomarkers. In *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*; Elsevier Inc., 2018; pp. 403–413 ISBN 9780128130063.

ANEXOS



8 ANEXOS

8.1 OTRAS PUBLICACIONES EN REVISTAS

8.1.1 Publicación 4: “A Targeted Approach by High Resolution Mass Spectrometry to Reveal New Compounds in Raisins”

Autores: **Danilo Escobar-Avello**, Alexandra Olmo-Cunillera, Julián Lozano-Castellón María Marhuenda-Muñoz, and Anna Vallverdú-Queralt.

Revista: *Molecules* 2020, 25, 1281.

DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25061281>

RESUMEN:

Las pasas son uvas pasas obtenidas principalmente de cultivares de *Vitis vinífera* L. y se consumen ampliamente en todo el mundo. Las pasas son ricas en compuestos bioactivos como los polifenoles, los que están asociados con una amplia gama de beneficios para la salud. El objetivo del presente estudio fue comparar los perfiles fenólicos de tres variedades diferentes de pasas (Thompson “sin semillas”, Moscatel y Sultanas). Los polifenoles totales (TP) se evaluaron mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C) y se observaron diferencias significativas entre todas las variedades de pasas. Además, se empleó cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas cuadrupolo-Orbitrap-trampa de iones lineal híbrida de ionización por electropulverización (LC/ESI-LTQ-Orbitrap-MS) para la identificación integral de constituyentes fenólicos. Se identificaron un total de 45 compuestos, incluidos los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, flavonoides, flavonoides, flavonoles, flavonas y estilbenoides.

Article

A Targeted Approach by High Resolution Mass Spectrometry to Reveal New Compounds in Raisins

Danilo Escobar-Avello ^{1,†} , Alexandra Olmo-Cunillera ^{1,2,†}, Julián Lozano-Castellón ^{1,2} ,
María Marhuenda-Muñoz ^{1,2}  and Anna Vallverdú-Queralt ^{1,2,*} 

¹ Department of Nutrition, Food Science and Gastronomy, School of Pharmacy and Food Sciences and XaRTA, Institute of Nutrition and Food Safety (INSA-UB), University of Barcelona, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain; daniescobar01@gmail.com (D.E.-A.); alexandra.olmo@ub.edu (A.O.-C.); julian.lozano@ub.edu (J.L.-C.); mmarhuendam@ub.edu (M.M.-M.)

² Consorcio CIBER, M.P. Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBn), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain

* Correspondence: avallverdu@ub.edu; Tel.: +34-934034843

† These authors contributed equally to the work.

Academic Editor: Francesco Cacciola

Received: 19 February 2020; Accepted: 10 March 2020; Published: 12 March 2020



Abstract: Raisins are dried grapes mostly obtained from cultivars of *Vitis vinifera* L. and are extensively consumed worldwide. They are rich in bioactive compounds such as polyphenols, which are associated with a broad range of health benefits. The aim of the present study was to compare the phenolic profiles of three different raisin varieties (Thompson seedless, Muscat, and sultanas). Total polyphenols (TPs) were evaluated by the Folin–Ciocalteu (F–C) assay and significant differences were observed among all raisin varieties. Furthermore, liquid chromatography coupled with electrospray ionization hybrid linear ion trap quadrupole–Orbitrap–mass spectrometry (LC/ESI–LTQ–Orbitrap–MS) was employed for the comprehensive identification of phenolic constituents. A total of 45 compounds were identified, including hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids, flavanoids, flavonoids, flavonols, flavones, and stilbenoids. The three varieties of raisins showed a similar phenolic profile, although the highest number of phenolic compounds was identified in Muscat raisins owing to the proanthocyanidins extracted from their seeds, while stilbenoids were not detected in the Thompson variety.

Keywords: polyphenols; dried fruit; *Vitis vinifera*; LC–LTQ–Orbitrap; condensed tannins

1. Introduction

Raisins are dried grapes mostly obtained from cultivars of *V. vinifera* L. and are extensively consumed worldwide. Although sometimes perceived as unhealthy because of their high sugar content, raisins represent an important source of bioactive compounds, including fiber and polyphenols, which may benefit human health [1].

Interest in phenolic compounds is growing as scientific research brings further evidence of their beneficial effects. The major polyphenols found in raisins are phenolic acids (caftaric and coumaric acid) and flavonols (quercetin and kaempferol glycosides, and rutin) [2–5]. Anthocyanins have also been identified in dark raisins [6–8]. Flavan-3-ols and procyanidins have been detected in Turkish raisins [7].

Scientific literature suggests that a long-term ingestion of foods rich in polyphenols protects against certain health conditions, such as cardiovascular and neurodegenerative diseases, cancer, and diabetes [9,10]. The antioxidant, immunomodulatory, and scavenging properties of catechins have been associated with the protection of neurons and the inhibition of the neurotoxic effects of the beta-amyloid protein, thus helping to ward off Alzheimer’s disease and dementia. Flavanoids may decrease cancer risk by the neutralization of free radicals. The risk of cardiovascular disease is

lowered by flavonoids, which prevent cholesterol oxidation, while anthocyanins are associated with the prevention and management of type 2 diabetes. Moreover, it is hypothesized that polyphenols promote the growth of beneficial gut microbiota [11].

The phenolic content of raisins is affected by multiple factors, including genetics (for instance, the presence or not of seeds and grape color) [12], environmental growing conditions, and the drying process (for instance, degree of temperature and UV-B radiation) [13–15]. Moreover, the type of analytical extraction procedure can also influence the phenolic profile detected [4,16].

High-performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most commonly applied methods to identify and quantify polyphenols in food [17], and UV/vis and DAD detectors are more frequently used than mass spectrometry (MS) because they are less expensive, comparably convenient to operate, and suitable for routine analysis [18]. However, HPLC coupled with MS allows a more accurate identification [17] and increases the range of phenolic compounds detected in a sample [19].

Although the phenolic content of raisins has been widely studied, the available data could be updated using recently developed techniques offering more specific identification. Orbitrap technology stands out for its high mass accuracy and resolution, which provides more information about compounds present in a mixture [20]. This is particularly useful for genomics, proteomics, and metabolomics studies analyzing highly complex matrices. This approach has been successfully used to identify phenolic compounds in grape cane extracts [21], wine extracts [22,23], culinary herbs and spices [24], tomatoes [25], and cacao and chocolate [26]. Therefore, the aim of this study was to identify the polyphenols in three types of commonly consumed raisins (Thompson seedless, Muscat, and sultanas) by liquid chromatography hybrid linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry (LC-LTQ-Orbitrap-MS) analysis.

2. Results and Discussion

2.1. Phenolic Profile of Commercial Raisins

Raisins have been reported as a good source of polyphenols with potential human health benefits and effects against different diseases [1].

The Folin–Ciocalteu (F–C) method gave results indicating a high polyphenol content in the three varieties of raisins analyzed. Overall, total polyphenol (TP) levels ranged from 327 to 664 mg GAE/100 g, with the highest amount in Muscat raisins (664 ± 15 mg GAE/100 g), followed by Thompson seedless (472 ± 7.7 mg GAE/100 g) and then sultanas (327 ± 3.9 mg GAE/100 g). Furthermore, significant differences ($p < 0.05$) in TP content were observed among all raisin varieties. These values are greater than those reported in raisins by Fabani et al. [5] (136–201 mg GAE/100 g) and Chiou et al. [27] (151–246 mg GAE/100 g), but comparable to other studies [12,16,28]. Differences in reported TP levels could be partially explained by different water content [29], environmental growing conditions [28], raisin variety [12], the drying process [14], and the choice of extraction solvents [16] or analytical methods [4].

A targeted analysis of phenolic compounds in raisins was performed using LC-LTQ-Orbitrap-MS. For the 45 compounds identified, accurate mass measurements of the $[M - H]^-$ ion, molecular formula (MF), and MS^2 fragment ions used for identification are listed in Table 1. The most represented classes of phenolic compounds in the extracts were phenolic acids (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids) and flavonoids (flavanols, flavanones, and flavonols). Some stilbenes were also identified. Although many of these compounds have been previously detected in raisins [2,5,7,12,13,16,27,28], to the best of our knowledge, six have never been identified in these raisin varieties.

Table 1. Phenolic compounds in raisin extracts tentatively identified by liquid chromatography coupled with electrospray ionization hybrid linear trap quadrupole-Orbitrap mass spectrometry (LC/ESI-LTQ-Orbitrap-MS) in negative mode.

Compounds	Raisins	Accurate Mass [M – H] [–]	MS/MS Ions (% Relative Abundance)	MF
PHENOLIC ACIDS AND DERIVATIVES				
HYDROXYBENZOIC ACIDS				
Galloyl-hexoside (1)	M,S	331.0657	169.0133(100), 125.0236(5)	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀
Gallic acid*	T,M,S	169.0135	125.0237(100)	C ₇ H ₆ O ₅
Protocatechuic acid-O-hexoside (1)	T,M,S	315.0709	153.0184(100), 109.0289(10)	C ₁₃ H ₁₆ O ₉
Galloyl-hexoside (2)	M,S	331.0656	169.0132 (100), 125.0236(5)	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀
Protocatechuic acid	T,M,S	153.0186	109.0289(100)	C ₇ H ₆ O ₄
Hydroxybenzoic acid hexoside	M,S	299.0761	137.0238(100), 179.0342(75), 239.0551(70), 209.0449(20)	C ₁₃ H ₁₆ O ₈
2-Hydroxybenzoic acid*	T,M,S	137.0238	93.0340(100)	C ₇ H ₆ O ₃
Gallic acid ethyl ester (ethylgallate)*	M	197.0446	169.0136(100)	C ₉ H ₁₀ O ₅
4-Hydroxybenzoic acid*	T,S	137.0238	93.0340(100)	C ₇ H ₆ O ₃
HYDROXYCINNAMIC ACIDS				
Cafaric acid (1)	M,S	311.0394	149.0079(100), 179.0337(40)	C ₁₃ H ₁₂ O ₉
Dihydroxy cinnamic acid (1)	T,M,S	179.0342	135.0444(100)	C ₉ H ₈ O ₄
Cafaric acid (2)	T,M,S	311.0395	149.0084(100), 179.0343(20)	C ₁₃ H ₁₂ O ₉
Coutaric acid	T,M,S	295.0447	163.0391(100)	C ₁₃ H ₁₂ O ₈
Coumaric acid-O-hexoside	T,M	325.0914	163.0390(100)	C ₁₅ H ₁₈ O ₈
Dihydroxy cinnamic acid (2)*	T,M,S	179.0343	135.0444(100)	C ₉ H ₈ O ₄
Fertaric acid	M,S	325.0550	193.0494(100), 149.0082(10)	C ₁₄ H ₁₄ O ₉
Ferulic acid-O-hexoside	T,M,S	355.1020	193.0498(100)	C ₁₆ H ₂₀ O ₉
FLAVONOIDS				
FLAVANOLS				
(PROANTHOCYANIDINS)				
B-type procyanidin dimer (1)	M	577.1330	425.0853(100), 451.1008(60), 407.0750(50), 289.0699(40), 559.1217(20)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
B-type procyanidin dimer (2)	M	577.1329	425.0852(100), 451.1007(60), 407.0749(50), 289.0698(30), 559.1218(10)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
Catechin*	M,S	289.0707	245.0807(100), 205.0496(40), 179.0342(15), 425.0853(15), 287.0540(15)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
B-type procyanidin trimer (1)	M	865.1942	425.0850(100), 451.1006(60), 407.0747(50), 289.0697(30), 559.1215(15)	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈
B-type procyanidin dimer (3)	M	577.1328	425.0853(100), 451.1009(60), 407.0750(40), 289.0699(30), 559.1221(10)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
B-type procyanidin dimer (4)	M	577.1326	245.0809(100), 205.0497(40), 179.0343(20)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Epicatechin*	M,S	289.0705	577.1319(100), 559.1220(40), 425.0851(20), 407.0746(35), 439.0646(5), 603.1113(5)	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆
(Epi)catechin gallate→(Epi)catechin (1)	M	729.1436	577.1312(100), 559.1214(40), 407.0747(30), 425.0850(20), 439.0644(5), 603.1092(5)	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆
(Epi)catechin gallate→(Epi)catechin (2)	M	729.1432	695.1354(100), 739.1614(60), 577.1322(60), 575.1161(40), 713.1462(40), 449.0839(20), 425.0851(20), 847.1826(20), 287.0540(20), 543.0894(15), 451.1001(15), 289.0692(10)	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈
B-type procyanidin trimer (2)	M	865.1944	559.0857(100), 407.0746(90), 577.0980(85), 603.1100(65), 441.0800(20), 451.1010(35), 711.1313(15)	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆
(Epi)catechin→(Epi)catechin gallate (1)	M	729.1429	407.0747(100), 603.1107(85), 577.1265(75), 559.0879(65), 451.1012(65), 441.0799(55), 711.1306(25), 425.0859(10)	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆
(Epi)catechin→(Epi)catechin gallate (2)	M	729.1436	425.0849(100), 451.1003(70), 407.0744(60), 289.0699(30), 559.1204(20), 287.0540(10)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
B-type procyanidin dimer (5)	M	577.1334	289.0699(100), 331.0439(25), 169.0132(20), 271.0595(10).	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀
Epicatechin gallate*	M	441.0811		

Table 1. Cont.

Compounds	Raisins	Accurate Mass [M – H]–	MS/MS Ions (% Relative Abundance)	MF
FLAVONOLS				
Rutin (quercetin-3-rutinoside)*	S	609.1428	301.0334(100), 300.0256(30)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
Quercetin-O-hexoside (1)	M,S	463.0864	301.0330(100)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
Quercetin-3-O-glucuronide*	T,M,S	477.0658	301.0334(100)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃
Quercetin-O-hexoside (2)	T,M,S	463.0865	301.0337(100)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
Kaempferol-3-O-glucoside*	M,S	447.0915	284.0311(100), 285.0387(60), 327.0491(15), 255.0284(5)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
Kaempferol-O-rutinoside	S	593.1491	285.0385(100), 255.0284(5)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
Kaempferol-O-hexoside	T,M,S	447.0917	284.0311(100), 285.0388(85), 255.0282(10)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
Isorhamnetin-O-hexoside	T,M,S	477.1021	314.0410(100), 315.0489(35)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂
Quercetin*	T,M,S	301.0341	178.9977(100), 151.0029(60)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
FLAVONES				
Luteolin-O-glucuronide	S	461.0710	285.0387(100), 175.0231(5)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂
FLAVANONES				
Eriodictyol-O-hexoside	M	449.1070	287.0546(100), 269.0441(30), 259.0598(30)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁
Hesperidin (hesperitin-7-rutinoside)*	T,M,S	609.1802	301.0699(100)	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅
STILBENES				
Stilbenoid tetramer (Hopeaphenol/Isohopeaphenol)	S	905.2557	811.2121(100), 717.1716(35)	C ₃₆ H ₄₂ O ₁₂
Stilbenoids dimer (viniferin)	M,S	453.1330	359.0905(100), 347.0903(65)	C ₂₈ H ₂₂ O ₆

T: Thompson; M: Muscat; S: sultana; MF: molecular formula. Isomers are shown in brackets. Fragment ions used for ID are listed in order of relative abundances. *Compounds identified by comparison with pure standards. Compounds (tentatively) identified for the first time in raisins are displayed in bold. All other compounds are tentatively identified using MS/MS data and comparing the fragments found with the literature (see Table S1).

2.1.1. Phenolic Acids and Derivatives

Phenolic acids are present in almost all plant-derived foods and are the main polyphenols in raisins. Their biological activities include effects against aging, diabetes, cardiovascular disease, and cancer [30].

Seventeen phenolic acids, hydroxycinnamic and hydroxybenzoic, were identified in the three raisin varieties (Table 1). The spectra generated by hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids showed the deprotonated molecule $[M - H]^-$ and the characteristic loss of CO_2 $[M - H - 44]^-$ [25,31], whereas those of phenolic acid-*O*-hexosides revealed the typical cleavage of the sugar moiety $[M - H - 162]^-$ [31].

Nine hydroxybenzoic acids—gallic acid (m/z 169.0135), protocatechuic acid-*O*-hexoside isomer 1 (m/z 315.0709), protocatechuic acid (m/z 153.0186), and 2-hydroxybenzoic acid (m/z 137.0238)—were detected in all raisin varieties. Furthermore, gallic acid was identified by comparison with its pure standard. On the other hand, two galloyl-hexoside (m/z 331.0657; m/z 331.0656) and hydroxybenzoic acid hexoside (m/z 299.0761), were only identified by MS^2 in Muscat and sultana varieties, while 4-hydroxybenzoic acid (m/z 137.0238) was detected in Thompson seedless and sultanas varieties. Lastly, gallic acid ethyl ester (m/z 197.0446) was identified in Muscat raisins and confirmed by comparison with the available standard. Gallic, protocatechuic, and 2-hydroxybenzoic acid have been previously found in Thompson raisins [12]. Interestingly, in other studies, protocatechuic acid has been found in raisins and not in grapes [3,4]. The presence of protocatechuic acid in raisins could be attributed to the drying process. On the other hand, some hydroxybenzoic acids hexosides have been previously reported in red (Cardinal) and white (Sabel) dried grapes [32].

A total of eight hydroxycinnamic acids were identified in the three raisin varieties. Two dihydroxycinnamic acid isomers 1 and 2 (m/z 179.0342; m/z 179.0343), caftaric acid isomer 2 (m/z 311.0395), coumaric acid (m/z 295.0447), and ferulic acid-*O*-hexoside (m/z 355.1020) were identified in all raisin varieties studied. Coumaric acid was tentatively identified based on the loss of the tartaric acid $[M - H - 132]^-$ and the presence of a fragment at m/z 163, attributed to a coumaric acid molecule [21,33,34]. Additionally, the dihydroxycinnamic acid isomer 2 was identified by comparison with its pure standard. On the other hand, caftaric acid isomer 1 (m/z 311.0394) and fertaric acid (m/z 325.0550) were only identified by MS^2 in Muscat and sultana varieties. Fertaric acid showed product ions at m/z 193 and m/z 149, attributed to ferulic acid and tartaric acid, respectively [33]. Lastly, coumaric acid-*O*-hexoside (m/z 325.0914) was detected in Thompson and Muscat varieties.

Most of the detected phenolic acids have already been reported in raisins [3,5,12,16,27,32], but to the best of our knowledge, coumaric and ferulic acid hexoside derivatives have not been detected in the studied varieties.

2.1.2. Flavanols (Proanthocyanidins)

Proanthocyanidins (PAs), also referred to as condensed tannins, are the most abundant plant-derived polyphenols. PAs exert several pharmacological effects, including antioxidant, antimicrobial, anti-cancer, and cardio-protective effects [35]. They are also useful for bio-based material design [36–38].

Fourteen flavanols were tentatively identified in the extract of Muscat raisins, probably because these contain seeds, which are known to have high levels of PAs [34]. The most common classes of PAs consist of subunits of catechin, epicatechin, and their gallic acid esters (mainly B-type oligomers). Flavan-3-ols catechin (m/z 289.0707) and epicatechin (m/z 289.0705) were also detected in Muscat and sultana varieties, and were confirmed after comparison with their standards.

Five B-type procyanidin dimers (m/z 577.1330; m/z 577.1329; m/z 577.1328; m/z 577.1326; m/z 577.1334) and two B-type procyanidin trimers (m/z 865.1942; m/z 865.1944) were detected in Muscat raisins. Procyanidins showed typical fragmentation pathways including quinone methide (QM) fission, heterolytic ring fission (HRF), and the retro-Diels-Alder (RDA) mechanism (Figure 1). The mass spectra of these compounds have been extensively described in previous studies [21,34].

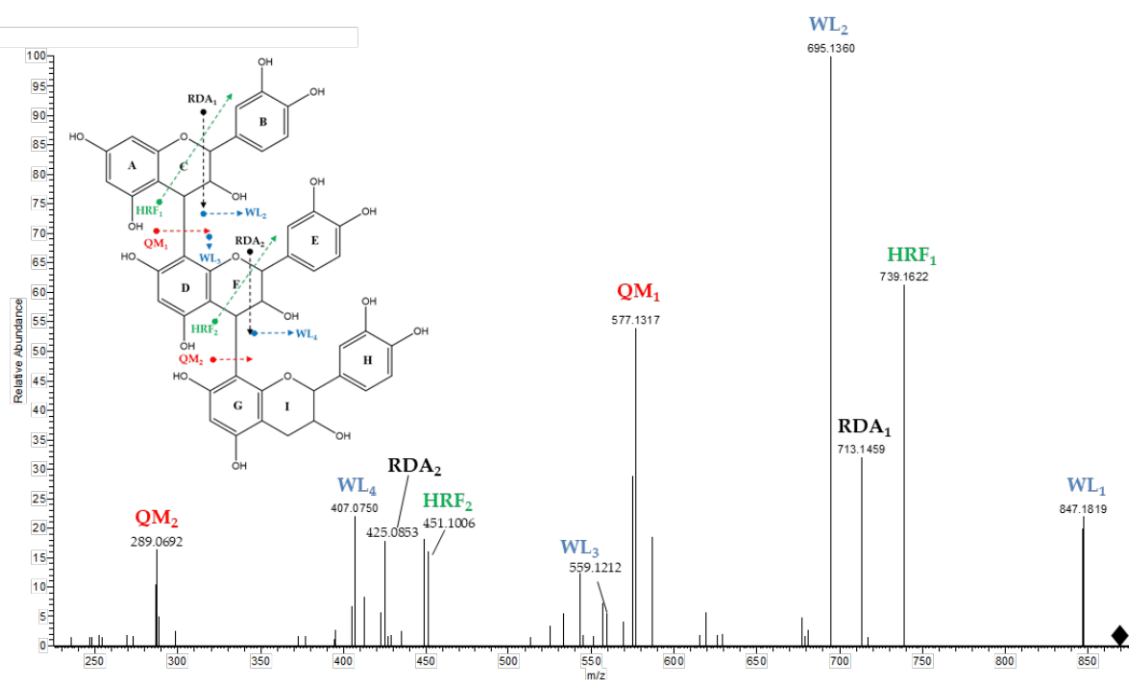
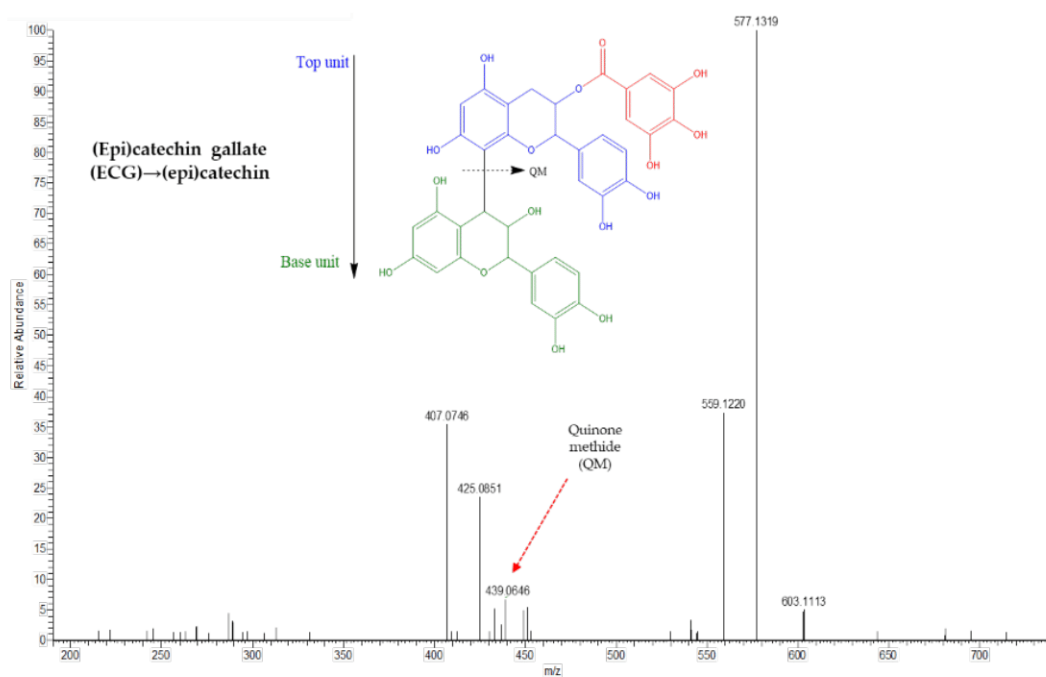


Figure 1. Fragmentation pathways of procyanidins (DP1–DP3) in negative mode electrospray ionization (ESI)-mass spectrometry (MS)ⁿ. Water loss (WL), Quinone methide fission (QM), heterolytic ring fission (HRF), and retro-Diels-Alder (RDA) mechanism.

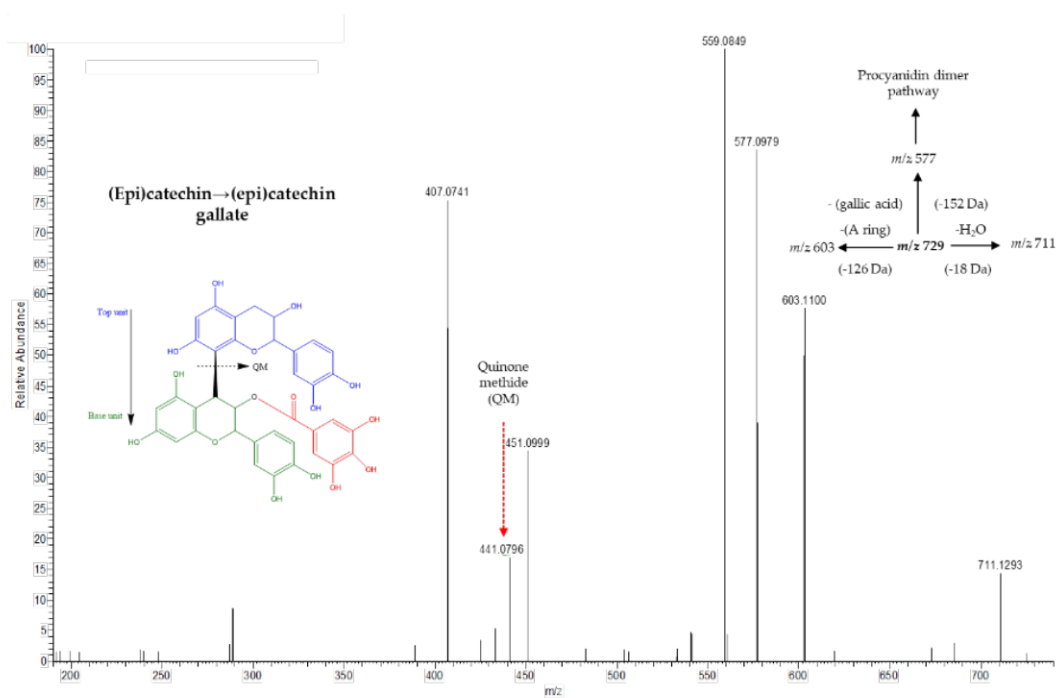
Catechin, epicatechin, and procyanidin (B1 and B2) have been identified in Turkish raisins [7]. Nevertheless, Karadeniz et al. [2] reported that procyanidins and flavan-3-ols were degraded when grapes were transformed into raisins. Similarly, Fabani et al. [5] detected the procyanidin dimer only in fresh grape extracts and suggested it underwent degradation during the sun-drying process, probably owing to enzymatic oxidation. In our work, procyanidin dimers and trimers, previously reported in grape seeds [34], were identified exclusively in the Muscat raisins, the only variety studied bearing seeds. PAs from grape seeds have shown broad pharmacological and therapeutic health effects against cancer, obesity, diabetes mellitus, and cardiovascular disease, which are related to oxidative stress and inflammatory processes [39].

Four PAs with gallic acid esters were also tentatively identified by MS² only in the Muscat variety: two (epi)catechin gallate→(epi)catechin (m/z 729.1436, m/z 729.1432), and two (epi)catechin→(epi)catechin gallate (m/z 729.1429, m/z 729.1436). Both forms produced ions at m/z 577, 559, 425, and 407, which are typical of B-type procyanidin dimers [21,40]. QM fission is a fundamental pathway underlying the gallic acid ester position [21]. Thus, the ions at m/z 439 and 441 were crucial in assigning the gallic acid ester to the upper and bottom positions, respectively [21] (Figure 2). (Epi)catechin-(epi)catechin gallate (m/z 729) has been previously detected in raisins [32], although the specific monomeric sequence is proposed here for the first time.

Epicatechin gallate (m/z 441.0811) was also identified only in Muscat raisins and confirmed by comparison with its standard. The mass spectra of epicatechin gallate showed two fragments from the cleavage of the ester bond at m/z 289 and 169 for epicatechin and gallic acid deprotonated moieties, respectively [21]. Epicatechin gallate has been previously identified in raisins [13].



(A)



(B)

Figure 2. The MS² product ion scan of m/z 729 shows key fragment ions at m/z 439 and 441 produced by QM fragmentation for (epi)catechin gallate (ECG) → (epi)catechin (A) and (epi)catechin → (epi)catechin gallate (B), respectively.

2.1.3. Flavonols, Flavones, and Derivatives

Flavonols are extensively distributed in plants and are present in numerous fruits and vegetables. Human intervention trials with isolated flavonols demonstrated an antihypertensive effect [41].

A total of nine flavonols and one flavone were tentatively identified in the three raisin varieties. Quercetin-3-*O*-glucuronide (m/z 477.0658), quercetin-*O*-hexoside isomer 2 (m/z 463.0865), kaempferol-*O*-hexoside (m/z 447.0917), isorhamnetin-*O*-hexoside (m/z 477.1021), and quercetin (m/z 301.0341) were detected in all raisin varieties. Quercetin-3-*O*-glucuronide and quercetin-*O*-hexoside showed the same fragment at m/z 301, owing to respective losses of glucuronide and hexoside moieties. Moreover, quercetin-3-*O*-glucuronide was confirmed by comparison with its pure standard. Kaempferol-*O*-hexoside produced the deprotonated aglycone fragment at m/z 285, suggesting it arose from either luteolin or kaempferol. Additional structural information provided by MS² detection of lower intensity ions allowed the aglycone to be identified as kaempferol, based on the characteristic product ion at m/z 255 [42]. Isorhamnetin-*O*-hexoside was tentatively identified by comparison with the mass spectra reported by Simirgiotis et al. [43]. Quercetin was confirmed by comparison with an authentic standard.

Quercetin-*O*-hexoside isomer 1 (m/z 463.0864) and kaempferol-3-*O*-glucoside (m/z 447.0915) were only detected in MS² mode in Muscat and sultana raisins. Both compounds showed the cleavage of the sugar moiety (−162 Da) generating the ions at m/z 301 (quercetin) and m/z 285 (kaempferol), respectively. Additionally, kaempferol-3-*O*-glucoside revealed a fragment at m/z 255 typical of kaempferol aglyconem, which was confirmed by comparison with a standard.

Rutin (m/z 609.1428), kaempferol-*O*-rutinoside (m/z 593.1491), and luteolin-*O*-glucuronide (flavone) (m/z 461.0710) were only detected in sultanas. The mass spectra of rutin showed ions at m/z 301 and 300 due to the loss of the rutinoside unit [$M - H - 308$][−], and to the radical anion of the aglycone (m/z 300) [44], respectively. Furthermore, rutin was confirmed by comparison with its pure standard. Kaempferol-*O*-rutinoside and luteolin-*O*-glucuronide revealed the same fragment at m/z 285 owing to the loss of rutinoside (−308 Da) and glucuronide (−176 Da) moieties, respectively. The characteristic product ions at m/z 255 and 175 allowed the identification of the aglycone as well as kaempferol and luteolin, respectively [42]. Luteolin-*O*-glucuronide was the only flavone detected in all varieties. Kaempferol-3-rutinoside has been previously reported in raisins [13].

The number of flavonol derivatives was higher in sultanas, which are produced by immersing grapes in an alkaline potassium carbonate solution before drying [45]. This chemical pretreatment could inactivate polyphenol oxidase, and thus protect the phenolic compounds from degradation.

Several studies have identified and quantified flavonols (e.g., rutin, quercetin-hexoside, quercetin-glucuronide, kaempferol-hexoside, isorhamnetin-hexoside, and quercetin) in raisins [2,5,13], but to the best of our knowledge, this is the first report of luteolin-*O*-glucuronide in these particular varieties.

2.1.4. Flavanones and Derivatives

Flavanones have been widely studied in citrus fruits. They are reported to enhance the defenses of the organism against oxidative stress and help in the prevention of cardiovascular diseases, atherosclerosis, and cancer [46]. Two conjugated flavanones were detected in raisins and identified through their MS spectra.

Hesperidin (m/z 609.1802) was detected in all three varieties and confirmed by comparison with its pure standard. Eriodictyol-*O*-hexoside (m/z 449.1070) was tentatively identified only in Muscat raisins. The MS² of m/z 449 showed a characteristic product ion at m/z 287 (eriodictyol) generated by the loss of a hexose moiety (−162 Da). Additionally, eriodictyol-*O*-hexoside was tentatively identified by comparison with the mass spectra of previous studies using the LTQ-Orbitrap to analyze red wine [31] and grape pomace [47]. To the best of our knowledge, this is the first report of eriodictyol-*O*-hexoside in raisins of these varieties, although it has been previously identified in grape skins [48].

2.1.5. Stilbenes and Derivatives

The most well-known stilbene is resveratrol, associated with activity against pathologies related to oxidative stress, inflammatory biomarkers, type 2 diabetes, and cardiovascular and neurological diseases [49]. Oligomer derivatives of resveratrol, which are formed from two to eight or even more resveratrol units, have multiple beneficial properties, and some are superior in activity, stability, and selectivity compared with resveratrol. In particular, hopeaphenol and viniferin present a wide range of preventive or anticancer properties [50].

A stilbenoid tetramer (hopeaphenol or isohopeaphenol) (m/z 905.2557) and a stilbenoid dimer (viniferin) (m/z 453.1330) were tentatively identified in two raisins varieties. A stilbenoid dimer was present in Muscat and sultana varieties, whereas a stilbenoid tetramer was only detected in sultanas, possibly owing to the production process described above. The MS² of stilbenoid tetramer revealed ions at m/z 811 and 717 produced by the loss of one and two phenol moieties, respectively [21]. The MS² of m/z 453 showed product ions at m/z 359 and 347 produced by the loss of a phenol group (−94 Da) and a 4-methylenecyclohexa-2,5-dienone (−106 Da), respectively [21]. Stilbenoid oligomers have been previously detected in grape canes [21,51], leaves [52], and stems [53], but as far as we know, this is the first time that a stilbenoid tetramer (hopeaphenol or isohopeaphenol) and viniferin have been identified in raisins of these varieties. Stilbenoids are compounds that perform a critical role in the defense mechanism of plants, particularly in the complex response to biotic and abiotic stress [52,54]. Thus, the drying process could provoke stress conditions and stimulate the presence of these phenolic compounds in raisins.

3. Materials and Methods

3.1. Standards and Reagents

All samples and standards were handled without exposure to light. Gallic, 2-hydroxybenzoic, 4-hydroxybenzoic and caffeic acids (3,4-dihydroxycinnamic acid), (+)-catechin, (−)-epicatechin, quercetin-3-rutinoside (rutin), quercetin-3-O-glucuronide, hesperitin-7-rutinoside (hesperidin), and quercetin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ethylgallate (gallic acid ethyl ester), (−)-epicatechin gallate, and kaempferol-3-O-glucoside were acquired from Extrasynthèse (Genay, France).

Folin–Ciocalteu (F–C) reagent was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile, water, formic acid, and ethanol were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). All solvents were of HPLC grade and all chemicals were of analytical reagent grade. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore Bedford, MA, USA).

3.2. Extraction of Polyphenols

Commercial raisins (*V. vinifera* L.) of three different types and origins—(i) Thompson seedless (from Chile), (ii) Muscat (from Spain), and (iii) sultanas (from Turkey)—were purchased in a local supermarket in Barcelona, Spain. The extraction was performed following a previously reported procedure with minor modifications [55].

A sample of each variety of raisin (0.5 g, $n = 3$) was homogenized with an ULTRA-TURRAX® (IKA, Staufen, Germany) for 30 seconds, and then vortexed for 1 min with 4 mL ethanol/water (80:20, v/v). Later, they were sonicated in an ultrasound bath (Bandelin electronic GmbH&Co.KG, Berlin, Germany) during 10 min and centrifuged at 4000 RPM for 5 min at 4 °C. The supernatants were collected and the extraction procedure was repeated twice. The supernatants obtained were combined and evaporated with a sample concentrator (MIVAC®, FisherScientific, UK) at room temperature under a stream of nitrogen gas, and the residue was reconstituted into 0.1% of aqueous formic acid (4 mL). The raisin extracts were filtered through a 13 mm, 0.45 µm PTFE filter into an amber vial and stored at −20 °C until analysis by LC-LTQ-Orbitrap.

3.3. LC-LTQ-Orbitrap-MS Analyses

Liquid chromatography analysis was performed using an Accela chromatograph (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with a quaternary pump, a photodiode array detector (PDA), and a thermostated autosampler. Chromatographic separation was carried out with an Atlantis T3 column 2.1×100 mm, $3 \mu\text{m}$ (Waters, Milford, MA, USA). Gradient elution of analytes was performed with $\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ H-COOH (solvent A) and CH_3CN (solvent B). The following gradient was used: 0 min, 2% B; 0–2 min, 8% B; 2–12 min, 20% B; 12–13 min, 30% B; 13–14 min, 100% B; 14–17 min, 100% B; and 17–18 min, 2% B, and the column was equilibrated for 5 min to initial conditions [21]. The flow and injection volume were 0.350 mL/min and 5 μL , respectively.

For accurate mass measurements, the LC system was coupled to an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with an ESI source operating in negative mode. Instrument control and data acquisition were performed with Xcalibur 3.0 software (Thermo Fisher Scientific). The mass range in Fourier transformation mass spectrometry (FTMS) mode was from m/z 100 to 1000 [21]. The most intense ions detected in the FTMS spectrum were selected for the data-dependent scan. Parent ions were fragmented by high-energy C-trap dissociation with normalized collision energy of 35 V and an activation time of 10 ms. Operation parameters were as follows: source voltage, 4 kV; auxiliary gas, 10 a.u. (arbitrary units); sweep gas, 2 a.u.; sheath gas, 20 a.u.; and capillary temperature, 275°C . Raisin samples were analyzed in FTMS mode at a resolving power of 30,000 (full width at half maximum at m/z 400) and data-dependent MS^2 events acquired at a resolving power of 15,000.

3.4. Analysis of Total Polyphenols

For the TP assay, each sample was analyzed in triplicate; 24 μL of the raisin extracts was mixed with 184 μL of Milli-Q water in a thermo microtiter 96-well plate (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Germany). Then, 12 μL of F-C reagent (2 N) and 30 μL of sodium carbonate (200 g/L) were added and mixed by vortex following the procedures described previously by our group [55]. The mixtures were incubated for 60 min at room temperature in the dark. After the reaction period, 50 μL of Milli-Q water was added and the absorbance was measured at 750 nm in a microplate reader (Bio-Rad iMark™, Feldkirchen, Germany). The results were expressed as mg of GAE/100 g.

3.5. Statistical Analysis

The significance of the results and statistical differences were analyzed using Statgraphics® Centurion (StatPoint, Inc., Warrenton, VA, USA). Analysis of variance was used to compare the means of groups of measurement data, followed by Tukey HSD post-hoc tests, with a significance level of $p = 0.05$.

4. Conclusions

The use of LC coupled to LTQ-Orbitrap MS proved to be an efficient and powerful analytical tool to identify a wide range of phenolic compounds in Thompson seedless, Muscat, and sultana raisins. A total of 45 phenolic compounds, namely, hydroxybenzoic (9) and hydroxycinnamic acids (8), flavonols (9), flavones (1), flavanones (2), stilbenes (2), and flavanols (14), were identified or tentatively characterized based mainly on their accurate mass measurements provided by the LTQ-Orbitrap, the fragmentation data from MS^2 analyses, as well as the mass information obtained from pure standards and the literature. Among the 45 identified phenolic compounds, coumaric acid-*O*-hexoside, ferulic acid-*O*-hexoside, luteolin-*O*-glucuronide, eriodictyol-*O*-hexoside, stilbenoid tetramer (hopeaphenol or isohopeaphenol), and viniferin, to our knowledge, have been identified for the first time in these raisin varieties.

The three types of raisins showed some differences in their phenolic profiles. The most notable difference was the presence of condensed tannins in Muscat raisins, attributed to their seed content.

Furthermore, sultanas showed a greater diversity of flavonols. The most commonly detected phenolic compound class in each raisin variety was phenolic acids.

This investigation achieved an exhaustive characterization of the phenolic profile of three widely consumed raisins, which might be helpful for further research on the health properties of distinct raisin varieties.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1420-3049/25/6/1281/s1>, Table S1: Phenolic compounds tentatively identified using LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS in negative mode: Retention time (min), error (ppm), and reference used for identification [21,33,34,43,47,55–61].

Author Contributions: Conceptualization, A.V.-Q. and M.M.-M.; methodology, J.L.-C., D.E.-A., and M.M.-M.; formal analysis, D.E.-A., A.O.-C., and J.L.-C.; investigation, D.E.-A. and A.O.-C.; resources, A.V.-Q.; data curation, D.E.-A. and A.O.-C.; writing—original draft preparation, D.E.-A. and A.O.-C.; writing—review and editing, A.V.-Q.; visualization, A.O.-C., D.E.-A., J.L.-C., M.M.-M., and A.V.-Q.; supervision, A.V.-Q.; project administration, A.V.-Q.; funding acquisition, A.V.-Q. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CICYT (AGL2016-79113-R) from the Spanish Ministry of Industry, Economy, and Competitiveness, the Centro de Investigación Biomédica en Red, (CIBEROBN) and Generalitat de Catalunya (2017SGR196).

Acknowledgments: D.E.-A. is grateful to the Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID)/Scholarship Program/ DOCTORADO BECAS CHILE/2017—72180476; A.O.-C. and M.M.-M. thank the Ministry of Science, Innovation, and Universities for the FPU contracts; and A.V.-Q. and J.L.-C. thank the Ministry of Science, Innovation, and Universities for the Ramon y Cajal contract (RYC-2016- 19355) and FPI contract [BES-2017-080017], respectively.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

Total polyphenols (TPs); Folin–Ciocalteu (F–C); gallic acid equivalents (GAE); liquid chromatography coupled with an electrospray ionization hybrid linear ion trap quadrupole–Orbitrap–mass spectrometry (LC/ESI-LTQ-Orbitrap-MS); high-performance liquid chromatography (HPLC); mass spectrometry (MS); molecular formula (MF); photodiode array detector (PDA); electrospray ionization (ESI); arbitrary units (a.u.); polytetrafluoroethylen (PTFE); Fourier transformation mass spectrometry (FTMS); proanthocyanidins (PAs); quinone methide (QM); heterolytic ring fission (HRF); retro-Diels–Alder (RDA); (Epi)catechin gallate (ECG).

References

- Olmo-Cunillera, A.; Escobar-Avello, D.; Pérez, A.J.; Marhuenda-Muñoz, M.; Lamuela-Raventós, R.M.; Vallverdú-Queralt, A. Is Eating Raisins Healthy? *Nutrients* **2019**, *12*, 54. [\[CrossRef\]](#)
- Karadeniz, F.; Durst, R.W.; Wrolstad, R.E. Polyphenolic composition of raisins. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5343–5350. [\[CrossRef\]](#)
- Parker, T.L.; Wang, X.H.; Pazmiño, J.; Engeseth, N.J. Antioxidant capacity and phenolic content of grapes, sun-dried raisins, and golden raisins and their effect on ex vivo serum antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8472–8477. [\[CrossRef\]](#)
- Williamson, G.; Carughi, A. Polyphenol content and health benefits of raisins. *Nutr. Res.* **2010**, *30*, 511–519. [\[CrossRef\]](#)
- Fabani, M.P.; Baroni, M.V.; Luna, L.; Lingua, M.S.; Monferran, M.V.; Paños, H.; Tapia, A.; Wunderlin, D.A.; Feresin, G.E. Changes in the phenolic profile of Argentinean fresh grapes during production of sun-dried raisins. *J. Food Compos. Anal.* **2017**, *58*, 23–32. [\[CrossRef\]](#)
- Chira, K.; Suh, J.H.; Saucier, C.; Teissèdre, P.L. Grape phenolics. *Phytotherapie* **2008**, *6*, 75–82. [\[CrossRef\]](#)
- Kelebek, H.; Jourdes, M.; Selli, S.; Teissèdre, P.L. Comparative evaluation of the phenolic content and antioxidant capacity of sun-dried raisins. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 2963–2972. [\[CrossRef\]](#)
- Chiou, A.; Panagopoulou, E.A.; Gatzali, F.; De Marchi, S.; Karathanos, V.T. Anthocyanins content and antioxidant capacity of Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena). *Food Chem.* **2014**, *146*, 157–165. [\[CrossRef\]](#)
- Medina-Remon, A.; Estruch, R.; Tresserra-Rimbau, A.; Vallverdu-Queralt, A.; Lamuela-Raventós, R.M. The Effect of Polyphenol Consumption on Blood Pressure. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1137–1149. [\[CrossRef\]](#)
- Tresserra-Rimbau, A.; Arranz, S.; Eder, M.; Vallverdu-Queralt, A. Dietary Polyphenols in the Prevention of Stroke. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 7467962. [\[CrossRef\]](#)

11. Cory, H.; Passarelli, S.; Szeto, J.; Tamez, M.; Mattei, J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front. Nutr.* **2018**, *5*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Meng, J.; Fang, Y.; Zhang, A.; Chen, S.; Xu, T.; Ren, Z.; Han, G.; Liu, J.; Li, H.; Zhang, Z.; et al. Phenolic content and antioxidant capacity of Chinese raisins produced in Xinjiang Province. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 2830–2836. [[CrossRef](#)]
13. Olivati, C.; de Oliveira Nishiyama, Y.P.; de Souza, R.T.; Janzantti, N.S.; Mauro, M.A.; Gomes, E.; Hermosín-Gutiérrez, I.; da Silva, R.; Lago-Vanzela, E.S. Effect of the pre-treatment and the drying process on the phenolic composition of raisins produced with a seedless Brazilian grape cultivar. *Food Res. Int.* **2019**, *116*, 190–199. [[CrossRef](#)]
14. Panagopoulou, E.A.; Chiou, A.; Nikolidaki, E.K.; Christea, M.; Karathanos, V.T. Corinthian raisins (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena) antioxidant and sugar content as affected by the drying process: a 3-year study. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 915–922. [[CrossRef](#)]
15. Mencarelli, F.; Bellincontro, A.; Nicoletti, I.; Cirilli, M.; Muleo, R.; Corradini, D. Chemical and biochemical change of healthy phenolic fractions in winegrape by means of postharvest dehydration. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 7557–7564. [[CrossRef](#)]
16. Zhao, B.; Hall, C.A. Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. *Food Chem.* **2008**, *108*, 511–518. [[CrossRef](#)]
17. Vallverdú-Queralt, A.; Lamuela-Raventós, R.M. Foodomics: A new tool to differentiate between organic and conventional foods. *Electrophoresis* **2016**, *37*, 1784–1794. [[CrossRef](#)]
18. Delgado, A.M.; Issaoui, M.; Chammem, N. Analysis of main and healthy Phenolic compounds in foods. *J. AOAC Int.* **2019**, *102*, 1356–1364. [[CrossRef](#)]
19. Kafkas, N.E.; Kosar, M.; Öz, A.T.; Mitchell, A.E. Advanced Analytical Methods for Phenolics in Fruits. *J. Food Qual.* **2018**, *2018*, 3836064. [[CrossRef](#)]
20. Makarov, A.; Grinfeld, D.; Ayzikov, K. Fundamentals of Orbitrap analyzer. In *Fundamentals and Applications of Fourier Transform Mass Spectrometry*; Kanawati, B., Schmitt-Kopplin, P., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 37–61.
21. Escobar-Avello, D.; Mardones, C.; Pérez, A.J.; Saéz, V.; Von Baer, D.; Vallverdú-Queralt, A. Phenolic Profile of Grape Canes: Novel Compounds Identified by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. 1–21. *Molecules* **2019**, *24*, 3763.
22. Vallverdú-Queralt, A.; Meudec, E.; Eder, M.; Lamuela-Raventós, R.M.; Sommerer, N.; Cheynier, V. The Hidden Face of Wine Polyphenol Polymerization Highlighted by High-Resolution Mass Spectrometry. *ChemistryOpen* **2017**, *6*, 336–339. [[CrossRef](#)]
23. Vallverdú-Queralt, A.; Meudec, E.; Eder, M.; Lamuela-Raventós, R.M.; Sommerer, N.; Cheynier, V. Targeted filtering reduces the complexity of UHPLC-Orbitrap-HRMS data to decipher polyphenol polymerization. *Food Chem.* **2017**, *227*, 255–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Vallverdú-Queralt, A.; Regueiro, J.; Rinaldi-Alvarenga, J.F.; Martínez-Huélamo, M.; Leal, L.N.; Lamuela-Raventós, R. Characterization of the phenolic and antioxidant profiles of selected culinary herbs and spices: caraway, turmeric, dill, marjoram and nutmeg. *Food Sci. Technol.* **2015**, *35*, 189–195. [[CrossRef](#)]
25. Vallverdú-Queralt, A.; Jáuregui, O.; Medina-Remón, A.; Andrés-Lacueva, C.; Lamuela-Raventós, R.M. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2986–2992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Fayeulle, N.; Vallverdú-Queralt, A.; Meudec, E.; Hue, C.; Boulanger, R.; Cheynier, V.; Sommerer, N. Characterization of new flavan-3-ol derivatives in fermented cocoa beans. *Food Chem.* **2018**, *259*, 207–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Chiou, A.; Karathanos, V.T.; Mylona, A.; Salta, F.N.; Preventi, F.; Andrikopoulos, N.K. Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *Food Chem.* **2007**, *102*, 516–522. [[CrossRef](#)]
28. Breksa, A.P.; Takeoka, G.R.; Hidalgo, M.B.; Vilches, A.; Vasse, J.; Ramming, D.W. Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selections. *Food Chem.* **2010**, *121*, 740–745. [[CrossRef](#)]
29. Serratos, M.P.; Lopez-Toledano, A.; Merida, J.; Medina, M. Changes in Color and Phenolic Compounds during the Raisining of Grape Cv. Pedro Ximenez. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2810–2816. [[CrossRef](#)]
30. Saibabu, V.; Fatima, Z.; Khan, L.A.; Hameed, S. Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2015**, *2015*, 1–10. [[CrossRef](#)]

31. Vallverdú-Queralt, A.; Boix, N.; Piqué, E.; Gómez-Catalan, J.; Medina-Remon, A.; Sasot, G.; Mercader-Martí, M.; Llobet, J.M.; Lamuela-Raventós, R.M. Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *Food Chem.* **2015**, *181*, 146–151. [\[CrossRef\]](#)
32. Zoubiri, L.; Bakir, S.; Barkat, M.; Carrillo, C.; Capanoglu, E. Changes in the phenolic profile, antioxidant capacity and in vitro bioaccessibility of two Algerian grape varieties, Cardinal and Dabouki (Sabel), during the production of traditional sun-dried raisins and homemade jam. *J. Berry Res.* **2019**, *9*, 1–16. [\[CrossRef\]](#)
33. Verbaere, A.; Meudec, E.; Cheynier, V.; Sommerer, N. Straightforward method to quantify GSH, GSSG, GRP, and hydroxycinnamic acids in wines by UPLC-MRM-MS. *J. Agr. Food Chem.* **2015**, *63*, 142–149.
34. Di Lecce, G.; Arranz, S.; Jáuregui, O.; Tresserra-Rimbau, A.; Quifer-Rada, P.; Lamuela-Raventós, R.M. Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chem.* **2014**, *145*, 874–882. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Smeriglio, A.; Barreca, D.; Bellocco, E.; Trombetta, D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 1244–1262. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. García, D.E.; Delgado, N.; Aranda, F.L.; Toledo, M.A.; Cabrera-Barjas, G.; Sintjago, E.M.; Escobar-Avello, D.; Paczkowski, S. Synthesis of maleilated polyflavonoids and lignin as functional bio-based building-blocks. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *123*, 154–163. [\[CrossRef\]](#)
37. García, D.E.; Gavino, J.; Escobar, D.; Cancino, R.A. Maleinated polyflavonoids and lignin as functional additives for three kinds of thermoplastics. *Iran. Polym. J.* **2017**, *26*, 295–304. [\[CrossRef\]](#)
38. García, D.E.; Fuentealba, C.A.; Salazar, J.P.; Pérez, M.A.; Escobar, D.; Pizzi, A. Mild hydroxypropylation of polyflavonoids obtained under pilot-plant scale. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *87*, 350–362. [\[CrossRef\]](#)
39. Rodríguez-Pérez, C.; García-Villanova, B.; Guerra-Hernández, E.; Verardo, V. Grape seeds proanthocyanidins: An overview of in vivo bioactivity in animal models. *Nutrients* **2019**, *11*, 2435. [\[CrossRef\]](#)
40. Jiménez-Aspee, F.; Theoduloz, C.; Soriano, M.D.; Ugalde-Arbizu, M.; Alberto, M.R.; Zampini, I.C.; Isla, M.I.; Simirigiotis, M.J.; Schmeda-Hirschmann, G. The native fruit geoffroea decorticans from arid Northern Chile: Phenolic composition, antioxidant activities and in vitro inhibition of pro-inflammatory and metabolic syndrome-associated enzymes. *Molecules* **2017**, *22*, 1–18.
41. Perez-Vizcaino, F.; Duarte, J. Flavonols and cardiovascular disease. *Mol. Aspects Med.* **2010**, *31*, 478–494. [\[CrossRef\]](#)
42. Li, Z.H.; Guo, H.; Xu, W.B.; Ge, J.; Li, X.; Alimu, M.; He, D.J. Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **2016**, *54*, 805–810. [\[CrossRef\]](#)
43. Simirigiotis, M.J.; Quispe, C.; Bórquez, J.; Areche, C.; Sepúlveda, B. Fast detection of phenolic compounds in extracts of easter pears (*Pyrus communis*) from the atacama desert by ultrahigh-performance liquid chromatography and mass spectrometry (UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS). *Molecules* **2016**, *21*, 92. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Vallverdú-Queralt, A.; Jáuregui, O.; Di Lecce, G.; Andrés-Lacueva, C.; Lamuela-Raventós, R.M. Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF). *Food Chem.* **2011**, *129*, 877–883. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Meyvaci, K.B.; Aksoy, U.; Eltem, R.; Altindili, A.; Akun, T.; Takin, E. Effect of yearly conditions and management practices on ochratoxin a production in sultana seedless vineyards. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2012**, *29*, 1157–1167. [\[CrossRef\]](#)
46. Barreca, D.; Gattuso, G.; Bellocco, E.; Calderaro, A.; Trombetta, D.; Smeriglio, A.; Laganà, G.; Daglia, M.; Meneghini, S.; Nabavi, S.M. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *BioFactors* **2017**, *43*, 495–506. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Sasot, G.; Martínez-Huélamo, M.; Vallverdú-Queralt, A.; Mercader-Martí, M.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Identification of phenolic metabolites in human urine after the intake of a functional food made from grape extract by a high resolution LTQ-Orbitrap-MS approach. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 435–444. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Perestrelo, R.; Lu, Y.; Santos, S.A.O.; Silvestre, A.J.D.; Neto, C.P.; Câmara, J.S.; Rocha, S.M. Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ: Novel phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. grape. *Food Chem.* **2012**, *135*, 94–104. [\[CrossRef\]](#)

49. Ramírez-Garza, S.L.; Laveriano-Santos, E.P.; Marhuenda-Muñoz, M.; Storniolo, C.E.; Tresserra-Rimbau, A.; Vallverdú-Queralt, A.; Lamuela-Raventós, R.M. Health effects of resveratrol: Results from human intervention trials. *Nutrients* **2018**, *10*, 1892. [[CrossRef](#)]
50. Xue, Y.Q.; Di, J.M.; Luo, Y.; Cheng, K.J.; Wei, X.; Shi, Z. Resveratrol oligomers for the prevention and treatment of cancers. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 765832. [[CrossRef](#)]
51. Riquelme, S.; Sáez, V.; Escobar, D.; Vergara, C.; Fuentealba, C.; Bustamante, L.; von Baer, D.; Jara, P.; Lamperti, L.; Mardones, C. Bench-scale extraction of stilbenoids and other phenolics from stored grape canes (*Vitis vinifera*): Optimization process, chemical characterization, and potential protection against oxidative damage. *J. Chil. Chem. Soc.* **2019**, *64*, 4414–4420. [[CrossRef](#)]
52. Mattivi, F.; Vrhovsek, U.; Malacarne, G.; Masuero, D.; Zulini, L.; Stefanini, M.; Mose, C.; Velasco, R.; Guella, G. Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid *Vitis vinifera* (Merzling × Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5364–5375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Pugajeva, I.; Perkons, I.; Górnas, P. Identification and determination of stilbenes by Q-TOF in grape skins, seeds, juice and stems. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *74*, 44–52. [[CrossRef](#)]
54. Gorena, T.; Saez, V.; Mardones, C.; Vergara, C.; Winterhalter, P.; Von Baer, D. Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chem.* **2014**, *155*, 256–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Vallverdú-Queralt, A.; Arranz, S.; Medina-Remón, A.; Casals-Ribes, I.; Lamuela-Raventós, M. Changes in phenolic content of tomato products during storage. *J. Agr. Food Chem.* **2011**, *59*, 9358–9365.
56. Quifer-Rada, P.; Vallverdú-Queralt, A.; Martínez-Huélamo, M.; Chiva-Blanch, G.; Jáuregui, O.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chem.* **2015**, *169*, 336–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Mena, P.; Calani, L.; Dall'Asta, C.; Galaverna, G.; García-Viguera, C.; Bruni, R.; Crozier, A.; Del Rio, D. Rapid and comprehensive evaluation of (Poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by UHPLC-MSⁿ. *Molecules* **2012**, *17*, 14821–14840. [[CrossRef](#)]
58. Las Heras, R.M.; Quifer-Rada, P.; Andrés, A.; Lamuela-Raventós, R. Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *J. Funct. Foods* **2016**, *23*, 370–377. [[CrossRef](#)]
59. Prodanov, M.; Vacas, V.; Hernández, T.; Estrella, I.; Amador, B.; Winterhalter, P. Chemical characterisation of Malvar grape seeds (*Vitis vinifera* L.) by ultrafiltration and RP-HPLC-PAD-MS. *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *31*, 284–292. [[CrossRef](#)]
60. Regueiro, J.; Sánchez-González, C.; Vallverdú-Queralt, A.; Simal-Gándara, J.; Lamuela-Raventós, R.; Izquierdo-Pulido, M. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. *Food Chem.* **2014**, *152*, 340–348. [[CrossRef](#)]
61. Mena, P.; Cirlini, M.; Tassotti, M.; Herrlinger, K.A.; Dall'Asta, C.; Del Rio, D. Phytochemical profiling of flavonoids, phenolic acids, terpenoids, and volatile fraction of a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *Molecules* **2016**, *21*, 1576. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples are not available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

8.1.2 Publicación 5: “Is eating raisins healthy?”

Autores: Alexandra Olmo-Cunillera, Danilo Escobar-Avello, Andy J. Pérez, María Marhuenda-Muñoz, Rosa M^a Lamuela-Raventós and Anna Vallverdú-Queralt.

Revista: *Nutrients* 2020, 12, 54.

DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12010054>

8.1.3 Publicación 6: “Bench-scale extraction of stilbenoids and other phenolics from stored grape canes (*Vitis vinifera*): Optimization process, chemical characterization, and potential protection against oxidative damage”

Autores: Sebastián Riquelme, Vania Sáez, Danilo Escobar, Carola Vergara, Cecilia Fuentealba, Luis Bustamante, Claudia Mardones.

Revista: *Journal of the Chilean Chemical Society*, 64(2), 4414–4420

DOI: <https://doi.org/10.4067/S0717-97072019000204414>.

8.1.4 Otras publicaciones previas

Publicación 7: “Synthesis of maleilated polyflavonoids and lignin as functional bio-based building-blocks”

Autores: Danny E. García, Nacarid Delgado, Francisca L. Aranda, Mariela A. Toledo, Gustavo Cabrera-Barjas, Eduard Maury Sintjago, Danilo Escobar-Avello, Sebastian Paczkowski

Revista: *Industrial Crops and Products*, 123,154–163.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.065>

Publicación 8: “Maleinated polyflavonoids and lignin as functional additives for three kinds of thermoplastics”

Autores: Danny E. García, Johannes Gavino, Danilo Escobar, Rodrigo A. Cancino.

Revista: *Iranian Polymer Journal*, 26(4), 295–304

DOI: <https://doi.org/10.1007/s13726-017-0519-z>

Publicación 9: “Mild hydroxypropylation of polyflavonoids obtained under pilot-plant scale.”

Autores: Danny E. García, Cecilia A. Fuentealba, Juan P. Salazar, Mónica A. Pérez, **Danilo Escobar**, A. Pizzi.

Revista: *Industrial Crops and Products* 2016, 87, 350–362.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.034>

Publicación 10: “Thermochemical properties of cellulose acetate blends with acetosolv and sawdust lignin: A comparative study”

Autores: Karol Peredo, **Danilo Escobar**, Johana Vega-Lara, Alex Berg, Miguel Pereira

Revista: *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 83, pp. 403–409

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.022>

Publicación 11: “Acetylation of bleached Kraft pulp: Effect of xylan content on properties of acetylated compounds”

Autores: Karol Peredo, Herna Reyes, **Danilo Escobar**, Johana Vega-Lara, Alex Berg, Miguel Pereira

Revista: *Carbohydrate Polymers*, 117, 1014–1020

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.004>

8.2 PATENTES DE INVENCION

8.2.1 Patente 1: “Un procedimiento para aumentar el contenido de estilbenos, esencialmente resveratrol, en sarmientos provenientes de las podas de *Vitis vinífera*”.

Inventores: Claudia Alejandra Mardones Peña, Dietrich von Baer von Lochow, Carola Andrea Vergara Rosales, Danilo Alejandro Escobar Avello, Fuentealba Becerra Cecilia Andrea, Sebastián Andrés Riquelme Rifo.

Solicitante: Universidad de Concepción.

Número de publicación: 2014003417

Primera publicación: 27-03-2015

Enlace: <https://patentscope.wipo.int/search/es/detail.jsf?docId=CL174158667>

Resumen:

Sistema de acondicionamiento de sarmientos provenientes de las podas de *Vitis vinífera* para aumentar el contenido de estilbenos, como resveratrol, a través de un contenedor para almacenamiento, el cual utiliza un contenedor ortoédrico para el almacenamiento de sarmientos y comprende al menos las siguientes etapas: (a) agregar agua entre 10 - 15% del volumen del contenedor y disolver sales con una concentración entre 360 - 1800 g/l hasta el punto de saturación; (b) posicionar de forma horizontal una sujeción de alambres en el contenedor; (c) apilar los sarmientos sobre el soporte de alambres, ocupando entre 55 - 65 % del volumen disponible del contenedor; y (c) cerrar herméticamente el contenedor y disponerlo bajo techo a una humedad entre 30 - 70%, temperatura entre 20 - 35 °C e intensidad lumínica de 0,1 - 15 lux, durante 90 a 150 días.

8.2.2 Patente 2: “Formulación de micropartículas de extracto de sarmientos de *Vitis vinífera* útil en las industrias nutracéutica y cosmética, además de su proceso de elaboración y sus usos”

Inventores: Javier Orlando Avendaño Godoy, Danilo Alejandro Escobar Avello, Javiana Elizabeth Luengo Contreras, Claudia Alejandra Mardones Peña, Elisa Maribel Ortega Medina, Carola Andrea Vergara Rosales, Dietrich von Baer von Lochow, Carolina Pilar Gómez Gaete, Sebastián Andrés Riquelme Rifo.

Solicitante: Universidad de Concepción.

Número de publicación: 2017002902

Fecha de publicación: 05-01-2018

Enlace: <https://patentscope.wipo.int/search/es/detail.jsf?docId=CL250856147>

Resumen:

Formulación de micropartículas de extracto de sarmientos de *Vitis vinífera* útil en las industrias nutracéutica y cosmética, que comprende al menos los siguientes componentes- extracto de sarmiento con un contenido de estilbenos y flavan-3-oles en un rango entre 500 - 2500 mg/L- ciclodextrina del tipo preferente hidroxipropil- β -ciclodextrina entre 0.5 - 5% p/v, como agente para la formación de un complejo de inclusión y- maltodextrina entre 5 - 15% p/v, como excipiente formador de matriz.

8.3 COMUNICACIONES EN CONGRESOS

8.3.1 Congreso 1: Condensed tannins in muscatel raisins variety: structural sequencing elucidation by LC-ESI-LTQ-ORBITRAP-MS.

Autores: **Danilo Escobar-Avello**, Alexandra Olmo-Cunillera, Julián Lozano-Castellón, María Marhuenda-Muñoz, Rosa María Lamuela-Raventós, and Anna Vallverdú-Queralt.

Nombre del Evento: V Workshop Anual de l'INSA-UB

Fecha y lugar: 13 de noviembre del 2019. Barcelona. España

Escobar-Avello, D.^{1,2*}, Olmo-Cunillera, A.¹, Lozano-Castellón, J.^{1,2}, Marhuenda-Muñoz, M.^{1,2}, Lamuela-Raventós, R.M.^{1,2} and Vallverdú-Queralt, A.^{1,2}

² Consorcio CIBER, M.P. Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain.

Raisins are dried grapes consumed worldwide that contain beneficial components for human health. They are rich in fiber, phytochemicals, phenolic compounds, and tartaric acid. The Muscatel variety shows the presence of condensed tannins (CTs) probably coming from their seeds. Proanthocyanidins, also called CTs, are the most abundant flavonoids in the human diet. Several epidemiological studies connect CTs consumption with health benefits. The structural elucidation of these compounds could help to understand their role in future research in mechanisms of action of these compounds in human health.

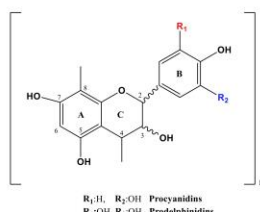
The flowchart illustrates the Polyphenol Extraction process, starting with **Muscatel Raisins**. The process involves **Homogenization (30 s)** using a blue homogenizer. The resulting mixture is then subjected to **double extraction**, which includes **Ethanol:water (80:20, v/v)** and **Ultrasound bath (10 min)** in a blue ultrasound bath. This is followed by **Centrifugation (4000 RPM; 5 min)** in a white centrifuge. The supernatant is then **Evaporated (N₂)** in a blue evaporator. The residue is **Reconstitution (0.1% formic acid)** in a blue vial, and the final product is **Filtration and stored (0.20 μm PTFE)** in a blue vial.

```

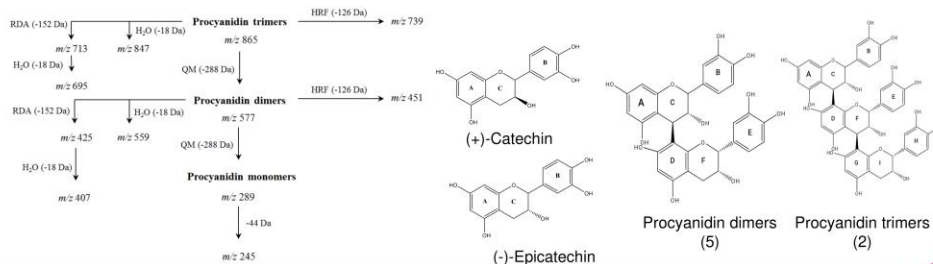
graph LR
    A[Muscatel Raisins] --> B[Homogenization 30 s]
    B --> C[Ethanol:water 80:20, v/v]
    C --> D[Ultrasound bath 10 min]
    D --> E[Centrifugation 4000 RPM; 5 min]
    E --> F[Evaporation N2]
    F --> G[Reconstitution 0.1% formic acid]
    G --> H[Filtration and stored 0.20 μm PTFE]
    subgraph Double_Extraction [double extraction]
        C
        D
        E
    end
  
```

The diagram illustrates the analytical workflow. It begins with a photograph of the **LQ-Orbitrap Velos** mass spectrometer. This is followed by a schematic of the **Samples HPLC-PDA** system, showing the flow from sample injection through various columns and detectors. The resulting data is then processed through a **Fourier transform** step, which leads to a mass spectrum plot. Finally, the plot is used for **Compound identification**, represented by a bar chart with colored peaks.

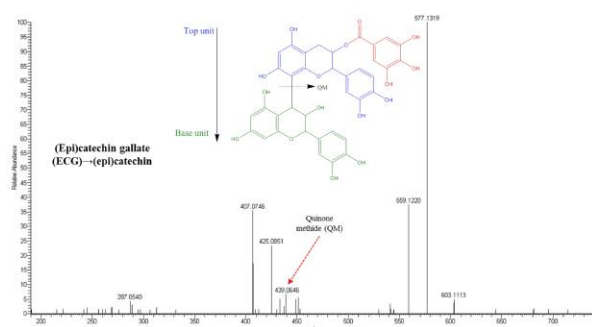
FRAGMENTATION PATHWAYS OF PROCYANIDINS (DP1-DP3) IN NEGATIVE MODE ESI-MSⁿ



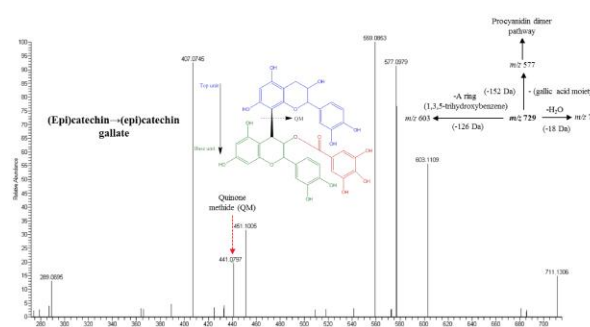
CONDENSED TANNINS



PRODELPHINIDIN DIMERS: SEQUENCING ELUCIDATION



The MS² product ion scan of *m/z* 729 shows the keys fragment ions at *m/z* 439 and 441 produced by quinone methide (QM) fragmentation for (Epi)catechin gallate (ECG)→(epi)catechin (2) and (Epi)catechin→(epi)catechin gallate (2), respectively.



Thirteen CTs with different degrees of polymerization (DP) were found. CTs showed typical fragmentation pathways derived from quinone methide (QM), heterolytic ring fission (HRF), and retro-Diels-Alder (RDA) mechanisms. Finally, some key fragments allowed to elucidate the specific position of each monomer for four prodelphinidins.

This research was funded by CICYT (AGL2016-79113-R) from the Spanish Ministry of Industry, Economy and Competitividad, the Centro de Investigación Biomédica en Red, (CIBEROBN) and Generalitat de Catalunya (2017SGR196). D.E.-A. is grateful to the CONICYT PFCBA/DOCTORADO BECAS CHILE/2017—72180476; A.O.C. and M.M.M thanks the Ministry of Science, Innovation and Universities for the FPU contract; A.V.-Q. and J.L.-C. thanks the Ministry of Science, Innovation and Universities for the Ramon y Cajal contract (RYC-2016-19355) and FPI contract IBES-2017-0800171, respectively.

8.3.2 Congreso 2: Grape cane by-products as food additives: Changes in phenolic profile during production and microencapsulation.

Autores: **Danilo Escobar-Avello**, Javier Avendaño, Sebastián Riquelme, Carolina Gómez, Javiana Luengo, Rosa María Lamuela-Raventós, and Anna Vallverdú-Queralt.

Nombre del Evento: 5º Congreso Latinoamericano sobre Biorrefinerías.

Fecha y lugar: 7-9 enero del 2019. Concepción. Chile.

ABSTRACT

Residues from wine industry have been the focus of many studies searching for such metabolites all around the world. Grape canes, obtained after annual pruning of vines, is a waste estimated in more than 120.000 tons per year only in Chile (Gorena et al., 2014). Grape canes have a wide diversity of polyphenolic compounds mainly oligostilbenoids and procyanidins with potential health benefits (Sáez et al., 2018). Consequently, polyphenols can be used for development of additives in functional foods.

In this work, an extract of grape canes (*Vitis vinifera* cv. Pinot Noir) was produced at pilot-scale in a reactor of 750 L. The extract was encapsulated with HP- β -cyclodextrins, and then dried by spray drying. Profiles and content of polyphenols were determined by liquid chromatography/electrospray ionisation-linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry (HPLC/ESI-LTQ-Orbitrap-MS). Change in the phenolics compositions was analysed and compared in the laboratory and pilot plant extraction as well as in microencapsulated extract.

Several changes in the phenolic profile between analytical and pilot extraction were observed such a decrease apparent of resveratrol, catechin, epicatechin and dimeric procyanidins, among other compounds. On the other hand, oligostilbenoids: **(i)** viniferin (m/z 453), **(ii)** hopeaphenol (m/z 905) and **(iii)** stilbenoid heterodimer (m/z 469) were successfully encapsulated.

The phenolic profile change during production and microencapsulation of the extract is relevant for evaluating in the future the efficiency and effectiveness of bioproducts as food additives.

References

- [1] Gorena, T., Saez, V., Mardones, C., Vergara, C., Winterhalter, P., & Von Baer, D. (2014). Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. Food Chemistry, 155, 256–263.
- [2] Sáez, V., Pastene, E., Vergara, C., Mardones, C., Hermosín-gutiérrez, I., Gómez-alonso, Gómez, M., Theoduloz C., Riquelme S., von Baer D. (2018). Oligostilbenoids in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir grape cane extract: Isolation, characterization, *in vitro* antioxidant capacity and anti-proliferative effect on cancer cells. Food Chemistry, 265, 101–110.

8.3.3 Congreso 3: Identification of phenolic compounds in raisins (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-LTQ-ORBITRAP-MS

Autores: **Danilo Escobar-Avello**, María Marhuenda-Muñoz, Marta Trius, Jose Fernando Rinaldi de Alvarenga, Anna Vallverdú-Queralt, and Rosa María Lamuela-Raventós.

Nombre del Evento: IV Workshop Annual de l'INSA-UB.

Fecha y lugar: 15 de noviembre del 2018. Barcelona. España.

IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN RAISINS (*VITIS VINIFERA* L.) BY HPLC-LTQ-ORBITRAP-MS

Escobar-Avello, D.^{1,2,4}, Marhuenda-Muñoz, M.^{1,2,3*}, Trius, M.¹, Rinaldi de Alvarenga, J.F.^{1,2}, Vallverdú-Queralt, A.^{1,2,3} and Lamuela-Raventós, R.M.^{1,2,3}.

¹Department of Nutrition, Food Sciences, and Gastronomy, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

²INSA-UB, Nutrition and Food Safety Research Institute, University of Barcelona, Food and Nutrition Torribera Campus, Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain.

³Centro de Investigación Biomédica en Red de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Sinesio Delgado 4, 28029 Madrid, Spain.

⁴Área de Bioproductos, Unidad de Desarrollo Tecnológico, Universidad de Concepción, 4191996 Coronel, Chile.

INSA

Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària

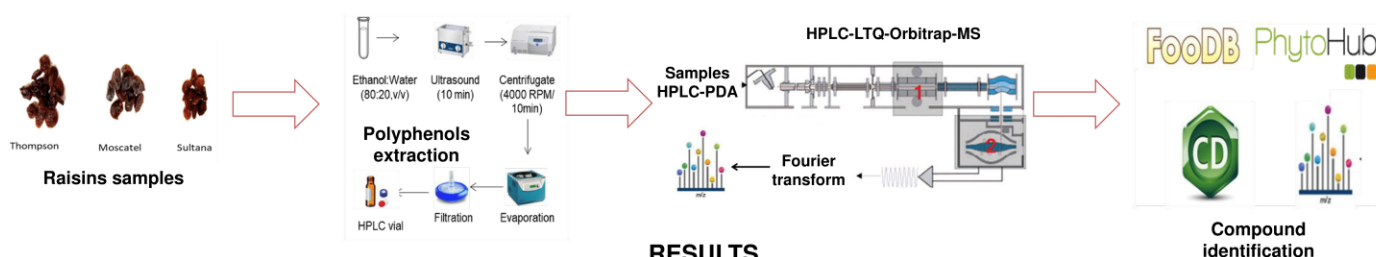
POLYPHENOL RESEARCH

udt Ciencia, Tecnología e Innovación en Bioeconomía

INTRODUCTION

Grapevine (*Vitis*) is considered to be one of the major fruit crops in the world based on hectares cultivated and economic value. Grapes are used not only for wine and cava production but also for products such as fresh fruit, juice, and raisins. Particularly, the world production of raisins for the period 2017/18 was estimated at 1.2 million metric tons. Raisins are a product of high nutritional value and provide carbohydrates, iron, vitamins, minerals and a wide variety of phenolic compounds with potential health benefits. The aim of the present work was to identify the phenolic profile of three different types of commercial raisins: Thompson (T), Moscatel (M) and Sultana (S) by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS analysis.

METHODOLOGY



RESULTS

Table 1: HYDROXYBENZOIC ACIDS

Compounds	Raisins	(M-H) ⁻	MS/MS ions (intensity %)
Gallic acid	T, M, S	169.0135	125.0237(100)
Gallic acid-O-hexoside (1)^(*)	M, S	331.0655	169.0133(100)
Protocatechuic acid	T, M, S	153.0186	109.0289 (100)
Hydroxybenzoic acid (1)	T, M, S	137.0237	93.0340(100)
Hydroxybenzoic acid (2)	T	137.0238	93.0340(100)
Protocatechuic acid-O-hexoside^(*)	T, M, S	315.0707	153.0184(100), 109.0289(10)
Gallic acid-O-hexoside (2)^(*)	M, S	331.0655	169.0133(100)
Syringic acid	M	197.0446	-
Vanillic acid	M	167.0369	-

Table 2: HYDROXYCINNAMIC ACIDS

Compounds	Raisins	(M-H) ⁻	MS/MS ions (intensity %)
Coumaric acid-O-hexoside^(*)	T, M	325.0915	145.0287(100), 163.0392(90), 187.0390(40), 119.0497(10)
Ferulic acid-O-hexoside^(*)	T, M, S	355.102	193.0498(100), 217.0495(30)
Fertaric acid	M, S	325.055	193.0494(100), 149.0082(10)
Caffeic acid	T, M, S	179.0342	135.0444(100)
Coutaric acid (1)	T, M, S	295.0447	163.0391(100)
Coutaric acid (2)	S	295.0444	163.0390(100)
Caftaric acid	T, M, S	311.0615	149.0082(100), 179.0339(40)

Table 3: FLAVAN-3-OLS

Compounds	Raisins	(M-H) ⁻	MS/MS ions (intensity %)
Catechin	M, S	289.0705	245.0809(100), 205.0498(40), 179.0343(10)
Epicatechin	M, S	289.0705	245.0809(100), 205.0497(40), 179.0343(20)
Epicatechin-O-gallate^(*)	M	441.0810	289.0699(100), 271.0595(10), 169.0132(20), 331.0439(25)
(epi)catechin-(epi)catechingallate 1^(*)	M	729.1432	577.1312(100), 559.1214(40), 407.0747(30)
(epi)catechin-(epi)catechingallate 2^(*)	M	729.1428	559.0854(100), 577.0972(80), 407.0744(85), 451.1005(30), 289.0694(10)
(epi)catechin-(epi)catechingallate 3^(*)	M	729.1430	407.0752(100), 603.1113(80), 451.1012(70), 577.1268(60), 289.0701(30), 559.0882(60)
Procyanidin dimer 1,2,3,4,5	M	577.1330	425.0853(100), 451.1008(60), 407.0750(50), 289.0699(40), 559.1217(20)
Procyanidin trimer 1^(*)	M	865.1941	695.1360(100), 739.1622(60), 577.1317(50), 407.0750(20)
Procyanidin trimer 2^(*)	M	865.1944	695.1354(100), 739.1614(60), 577.1322(70), 407.0743(20)

Table 4: FLAVANONES

Compounds	Raisins	(M-H) ⁻	MS/MS ions(intensity %)
Hesperidin^(*)	M, S	609.1795	301.0694(100)
Eriodictiol-O-hexoside^(*)	M, S	449.0974	449.0965(100), 287.0442(60)

Table 5: FLAVONOLS

Compounds	Raisins	(M-H) ⁻	MS/MS (intensity %)
Kaempferol-O-hexoside	T, M, S	447.0915	285.0388(60), 447.0908(60), 301.0334(100)
Quercetin-O-glucuronide	T, M, S	477.0658	301.0334(100)
Quercetin	T, M, S	301.0340	178.9976(100), 301.0337(80), 151.0029(60)
Rutin	T, S	609.1436	-
Quercetin-O-hexoside	T, M, S	463.0864	301.0337(100)

(*) Novel polyphenols in raisins.

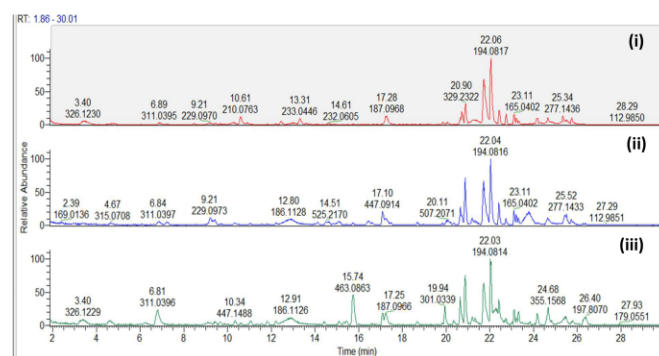


Figure 1. Raisins FTMS chromatograms. (i) Thompson (T) (ii) Moscatel (M) and (iii) Sultana.

CONCLUSIONS

Thirty-six phenolic compounds were identified. The main classes of compounds present were: hydroxybenzoic acids (9) and hydroxycinnamic acids (7) with their own derivatives; flavan-3-ols (13), flavonols (5), flavanones (2). To date, and to our knowledge, 13 compounds have never been described in raisins

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CICYT (AGL2016-79113-R) from the Spanish Ministry of Industry, Economy and Competitiveness, the Centro de Investigación Biomédica en Red, (CIBEROBN) and Generalitat de Catalunya (2017SGR196). Project PCI-PCI-REDES 170051. And the FI-AGAU-2018 and CONICYT Chile 12165/2017 scholarships. AVQ thanks the ministry of Science, Innovation and Universities for the Ramon y Cajal contract.

8.3.4 Congreso 4: Mediterranean dried fruits are a rich source of phenolic compounds.

Autores: María Marhuenda-Muñoz, **Danilo Escobar-Avello**, Marta Trius, Jose Fernando Rinaldi de Alvarenga, Anna Vallverdú-Queralt, and Rosa María Lamuela-Raventós.

Nombre de los Eventos: XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición. V Reunión de Jóvenes Investigadores. X Jornada de la Associació Catalana de Ciències de l'Alimentació.

Fecha y lugar: 26-29 junio del 2018. Barcelona. España.

MEDITERRANEAN DRIED FRUITS ARE A RICH SOURCE OF PHENOLIC COMPOUNDS

M. Marhuenda-Muñoz^{1,2}; D. Escobar-Avello^{1,2}; M. Trius¹; J.F. Rinaldi de Alvarenga¹; A. Vallverdú-Queralt^{1,2,3}; R.M. Lamuela-Raventós^{1,2,3}.

¹Department of Nutrition, Food Sciences, and Gastronomy, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

²INSA-UB, Nutrition and Food Safety Research Institute, University of Barcelona, Food and Nutrition Torribera Campus, Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain.

³Centro de Investigación Biomédica en Red de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Sinesio Delgado 4, 28029 Madrid, Spain.

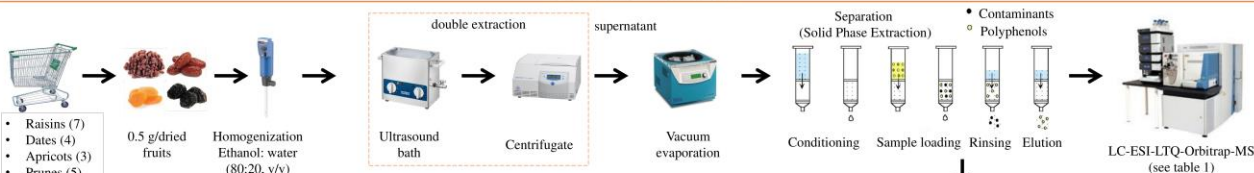
INTRODUCTION

Dried fruits (DF) are a form of fruit that have all of their bioactive non-volatile compounds concentrated due to a dehydration process¹. They are consumed worldwide and have potential benefits in type 2 diabetes and other diseases related to metabolic syndrome². Epidemiological studies suggest an important role of fresh fruit consumption in the prevention of chronic diseases, studies with DF are limited, though. The beneficial effects of DF have been attributed to their high fiber and phenolic compounds content, however, the specific identity of the main phenolic compounds have not been thoroughly established yet^{3,4}.

OBJECTIVES

To measure and compare the total polyphenol content of different commercial dried fruits (raisins, dates, dried apricots and prunes) and identify their phenolic profile by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS analysis.

METHODOLOGY



RESULTS

Table 1. Tentative identification of phenolic compounds.

Compounds	Rt (min)	Raisins	Dates	Apricots	Prunes	Accurate mass (M-H) ⁻	MS/MS ions (intensity %)	Δ (ppm)	Molecular Formula (MF)
Benzoic acids									
Gallic acid	2.44	X		X		169.0135	125.0237 (100)	-4.5350	C ₇ H ₆ O ₅
Gallic acid-O-hexoside (1)	4.93	X				331.0655	169.0133 (100)	-4.6210	C ₁₃ H ₁₄ O ₉
Protocatechuic acid	4.93	X		X		153.0186	109.0289 (100)	-4.4570	C ₇ H ₆ O ₄
Hydroxybenzoic acid (1)	7.21	X				137.0237	93.0340 (100)	-5.0160	C ₇ H ₆ O ₄
Hydroxybenzoic acid (2)	15.37	X				137.0238	93.0340 (100)	-4.8700	C ₇ H ₆ O ₄
Protocatechuic acid-O-hexoside	4.72	X		X		315.0707	153.0184 (100), 109.0289 (10)	-4.4600	C ₁₃ H ₁₄ O ₉
Gallic acid-O-hexoside (2)	4.93	X				331.0655	169.0133 (100)	-4.6210	C ₁₃ H ₁₄ O ₉
Strigic acid	12.64	X		X		197.0446	-	-8.5550	C ₁₀ H ₈ O ₆
Vanillic acid	23.11	X				167.0369	-	-	C ₈ H ₈ O ₅
Hydroxycinnamic acids									
Coumaric acid-O-hexoside (1)	9.85	X		X	X	325.0915	163.0392 (100)	-4.4900	C ₁₃ H ₁₄ O ₉
Coumaric acid-O-hexoside (2)	9.85	X		X	X	325.0917	163.0390 (100)	-3.6400	C ₁₃ H ₁₄ O ₉
Ferulic acid-O-hexoside	11.0	X		X		335.1020	217.0495 (100), 153.0498 (100)	-4.1270	C ₁₈ H ₁₈ O ₁₀
Ferulic acid	10.39	X				325.0550	193.0494 (100), 149.0082 (10)	-4.5800	C ₁₈ H ₁₆ O ₈
Caffeic acid	6.89	X		X		179.0342	135.0444 (100)	-4.4240	C ₉ H ₈ O ₄
Coumaric acid (1)	9.04	X				295.0447	163.0391 (100)	-4.0731	C ₁₃ H ₁₄ O ₈
Coumaric acid (2)	8.78	X				295.0444	163.0390 (100)	-5.2210	C ₁₃ H ₁₄ O ₈
Caffeic acid	6.85	X				311.0615	149.0082 (100), 179.0339 (40)	-4.4850	C ₁₃ H ₁₄ O ₈
Caffeoylquinic acid	10.21	X		X		353.0859	191.0547 (20), 179.0335 (50), 173.0443 (100)	-2.9500	C ₁₈ H ₁₈ O ₁₀
Caffeoylshikimic acid	11.67	X		X		335.0757	179.0339 (100), 161.0234 (60), 135.0443 (20)	-4.8900	C ₁₈ H ₁₈ O ₁₀
Shikimic acid-O-hexoside	11.91	X				385.1121	223.0595 (100)	-	C ₁₈ H ₁₈ O ₁₀
Neochlorogenic acid	7.17	X		X		353.0862	191.0549 (100), 179.0340 (50), 135.0444 (10)	-4.5100	C ₁₈ H ₁₈ O ₁₀
Chlorogenic acid	9.82	X		X		353.0867	191.0550 (100), 179.0339 (10)	-3.2100	C ₁₈ H ₁₈ O ₁₀
Flavan-3-ols									
Catechin	9.36	X				289.0705	245.0809 (100), 205.0498 (40), 179.0343 (10)	-4.1910	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Epicatechin	11.53	X				289.0705	245.0809 (100), 205.0497 (40), 179.0343 (20)	-4.6750	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Epicatechin-O-gallate	14.86	X				441.0810	289.0699 (100), 271.0595 (10), 169.0132 (20), 331.0439 (20)	-3.9670	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
(epi)catechin-(epi)gallocatechin (1)	12.13	X				729.1432	577.1312 (100), 559.1214 (40), 407.0747 (30)	-4.6050	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₄
(epi)catechin-(epi)gallocatechin (2)	12.61	X				729.1428	559.0854 (100), 577.0972 (80), 407.0744 (85), 451.1005 (20), 289.0698 (10)	-4.5370	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₄
(epi)catechin-(epi)gallocatechin (3)	12.93	X				729.1430	407.0752 (100), 603.1113 (80), 451.1012 (70), 577.1268 (60), 289.0701 (50), 559.0852 (60)	-4.2620	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₄
Procyanidin dimer 1	8.72	X				577.1330	425.0853 (100), 451.1006 (60), 407.0750 (50), 289.0699 (40), 559.1217 (20)	-3.7420	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂
Procyanidin dimer 2	8.98	X				577.1329	425.0852 (100), 451.1007 (60), 407.0749 (50), 289.0698 (40), 559.1215 (15)	-3.9400	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂
Procyanidin dimer 3	10.36	X				577.1328	425.0850 (100), 451.1006 (60), 407.0747 (50), 289.0697 (40), 559.1214 (10)	-4.0190	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂
Procyanidin dimer 4	10.79	X				577.1326	425.0853 (100), 451.1009 (60), 407.0750 (40), 289.0699 (30), 559.1221 (10)	-4.0010	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂
Procyanidin dimer 5	18.5	X				577.1328	425.0849 (100), 451.1003 (60), 407.0744 (60), 289.0699 (30), 559.1204 (20)	-4.0300	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂
Procyanidin trimer 1	10.02	X				865.1941	695.1360 (100), 739.1622 (60), 577.1317 (50), 407.0750 (20)	-5.1000	C ₃₀ H ₂₈ O ₁₆
Procyanidin trimer 2	12.54	X				865.1944	695.1354 (100), 739.1614 (60), 577.1322 (70), 407.0743 (20)	-4.7590	C ₃₀ H ₂₈ O ₁₆
Flavones									
Kaempferol-O-hexoside	16.82	X				447.0915	285.0388 (60), 447.0908 (60)	-3.9470	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
Quercetin-O-glucuronide	15.76	X				477.0658	301.0334 (100)	-1.4660	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
Quercetin	19.95	X				301.0340	301.0337 (80), 178.9976 (100), 151.0029 (60)	-4.6370	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
Rutin	15.35	X		X	X	609.1429	301.0332 (100)	-6.9122	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₆
Isoquercitrin	15.78	X		X	X	463.0859	301.0333 (100)	0.3567	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₅
Isoquercitrin-O-gallate	16.36	X				543.0432	301.0334 (100), 341.0007 (20), 463.0857 (5)	2.8912	C ₃₃ H ₃₀ O ₁₈
Isofalconarin-O-rutinoside	17.09	X				623.1590	315.0486 (100), 300.0254 (20)	-	C ₃₃ H ₃₀ O ₁₈
Flavanones									
Hesperidin	17.57	X		X		609.1795	301.0694 (100)	-4.9470	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₅
Eriodictiol-O-hexoside	11.06	X		X		449.1070	287.0540 (100), 259.0592 (20)	1.1801	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁
Flavonols									
Apigenin-C-hexoside	12.42	X				593.1493	473.1057 (100), 353.0642 (20)	-3.2090	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₅
Diosmetin-O-rutinoside	16.77	X				607.1646	299.0541 (100), 284.0308 (20)	-4.3804	C ₃₀ H ₂₈ O ₁₆
Unknowns									
unknown 1	17.47		X			477.1019	314.0412 (100), 315.0489 (20), 357.0592 (15)	-4.4420	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₅
unknown 2	2.4			X		331.1021	285.1088 (100), 263.1269 (80), 153.0910 (30)	-1.5958	C ₁₃ H ₁₄ O ₉
unknown 3	1.94			X		295.1021	251.1274 (100)	-1.2323	C ₁₁ H ₁₀ O ₆
unknown 4	9.15			X		311.0615	267.1223 (100), 249.1117 (100), 205.1224 (90)	-1.4981	C ₁₃ H ₁₄ O ₉

CONCLUSIONS

DF could be an important source of phenolic compounds in the Mediterranean diet. A daily intake of 30 g of these fruits would represent a consumption between 12.2 and 25.5 mg polyphenols.

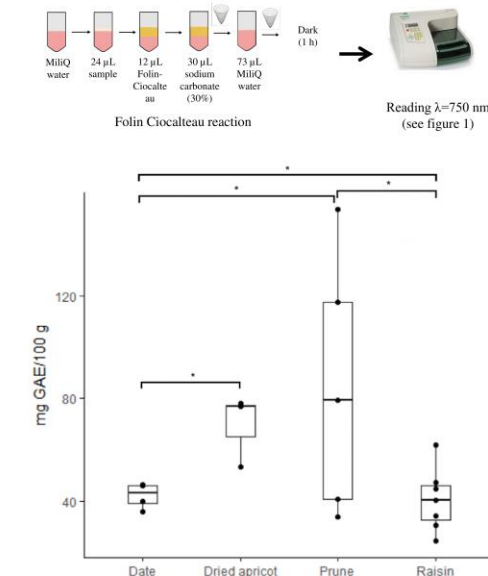


Figure 1. Boxplot for total polyphenol content among the different dried fruits. * p < 0.0001 for Dunn Kruskal-Wallis multiple comparison test. GAE: Gallic acid equivalent.

REFERENCES

- Chang, S.K. *et al. J Funct Foods*. 2016;21:113-132
- Chan, R. *et al. PLoS ONE*. 2015;10:e0139310
- Vallverdú-Queralt, A. *et al. Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010;24:2986-2992
- Vallverdú-Queralt, A. *et al. Food Chem*. 2014;154:299-307

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CICYT (AGL2016-79113-R) from the Spanish Ministry of Industry, Economy and Competitiveness, the Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBEROBN) and Generalitat de Catalunya (2017SGR196). And the FI-AGAUR-2018 and CONICYT Chile 12165/2017 scholarships.

8.3.5 Congreso 5: Total polyphenol content of commercial dried fruits.

Autores: María Marhuenda-Muñoz, **Danilo Escobar-Avello**, Jose Fernando Rinaldi de Alvarenga, Paola Quifer-Rada, Anna Vallverdú-Queralt, and Rosa María Lamuela-Raventós.

Nombre de los Eventos: XIIth Barcelona International Conference on the Mediterranean Diet.

Fecha y lugar: 18-19 abril del 2018. Barcelona. España.

María Marhuenda-Muñoz^{*1,2,3}, Danilo Escobar-Avello^{1,2}, José Fernando Rinaldi de Alvarenga¹, Paola Quifer-Rada^{1,2,3}, Anna Vallverdú-Queralt^{1,2}, Rosa M. Lamuela-Raventós^{1,2}

¹Department of Nutrition, Food Sciences, and Gastronomy, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

²INSA-UB, Nutrition and Food Safety Research Institute, University of Barcelona, Food and Nutrition Torribera Campus, Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

³Centro de Investigación Biomédica en Red de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Sinesio Delgado 4, 28029 Madrid, Spain

INTRODUCTION

Dried fruits are a form of fruit that has been dehydrated, thus, all of their bioactive non-volatile compounds are concentrated. Despite their high sugar content, their consumption has increased in the last decades because of the benefits of their polyphenols and high fiber. Polyphenols are the most diverse and abundant secondary metabolites produced by plants in response to stress. Their consumption has been correlated with a decrease in mortality, cardiovascular disease and diabetes among others.

OBJECTIVE

To measure and compare the total polyphenol content of different commercial dried fruits (raisins, dates, dried apricots and prunes), to know their contribution in the diet.

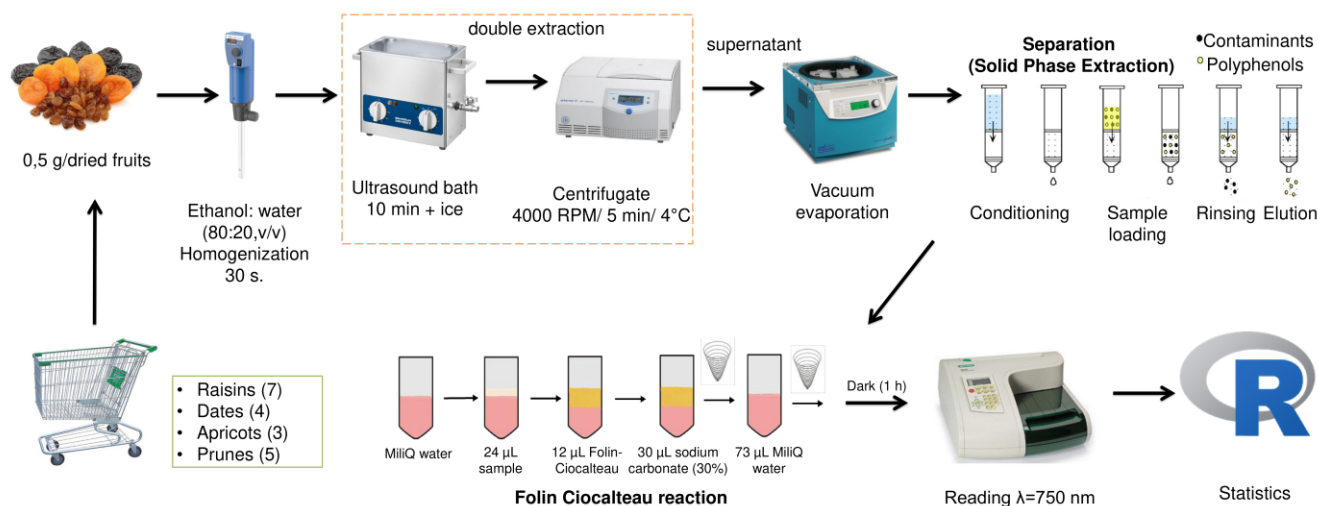
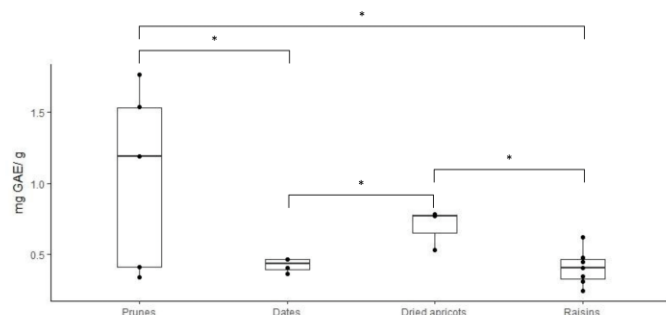
METHODOLOGY**RESULTS****TOTAL POLYPHENOL CONTENT OF DRIED FRUITS**

Figure 1. Boxplot for total polyphenol content among the different dried fruits. * $p < 0.0001$ for Dunn Kruskal-Wallis multiple comparison test

Total polyphenol content of dried fruits from different commercial suppliers was analyzed. Comparing among the suppliers and the types of dried fruits, after eliminating the possible interferences of reducing sugars and other molecules, prunes (0.981 ± 0.647 mg GAE/g) and, to a lesser extent, dried apricots (0.694 ± 0.139 mg GAE/g) have the highest polyphenol content while dates (0.423 ± 0.049 mg GAE/g) and raisins (0.408 ± 0.123 mg GAE/g) have the lowest (Figure 1).

CONCLUSIONS

In general, prune, among the four dried fruits have the highest polyphenolic content. However, there is a considerable difference between different suppliers, having two of them, a much lower polyphenol content. Therefore, fruits varieties, processing and storage conditions might be key factors for evaluating the contribution of dried fruits in the Mediterranean diet.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CICYT (AGL2016-79113-R) from the Spanish Ministry of Industry, Economy and Competitiveness, the Centro de Investigación Biomédica en Red, (CIBEROBN) and Generalitat de Catalunya (2017SGR196). And the FI-AGAUR-2018 and CONICYT Chile 12165/2017 scholarships.

8.3.6 Congreso 6: Grape cane extracts: An opportunity for the development of novel additives for food Chilean industry.

Autores: **Danilo Escobar-Avello**, Sebastián Riquelme, Claudia Mardones, Carola Vergara, Dietrich von Baer.

Nombre del Evento: III Workshop Annual de l'INSA-UB.

Fecha y lugar: 16 de noviembre del 2017. Barcelona. España.

"GRAPE CANE EXTRACTS: AN OPPORTUNITY FOR THE DEVELOPMENT OF NOVEL ADDITIVES FOR FOOD CHILEAN INDUSTRY"

Escobar-Avello, D.^{1,2}, Riquelme, S.^{2,3,4}, Mardones, C.³, Vergara, C.³, von Baer, D.³¹Nutrition, Food Science and Gastronomy Department, School of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, Barcelona, Spain²Bioproducts Area, Technological Development Unit, University of Concepción, Coronel, Chile.³Department of Instrumental Analysis, Faculty of Pharmacy, University of Concepción, Concepción, Chile.⁴Doctoral Program in Analytical Technologies, University of Concepción, Concepción, Biobío, Chile

d.escobar@udt.cl

NATURAL ANTIOXIDANT GROUP

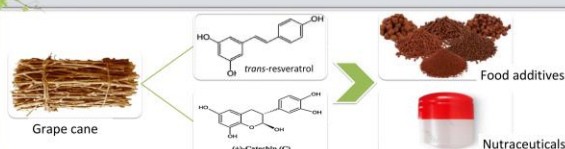
INSA

POLYPHENOL RESEARCH

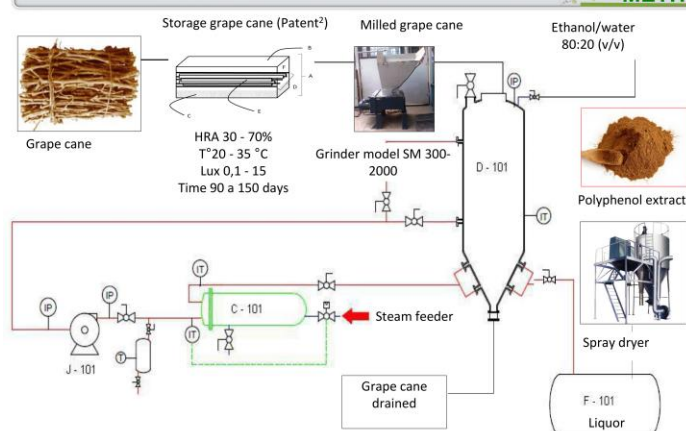
Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària

INTRODUCTION

Grape canes, obtained after annual pruning of wines, is a waste estimated in more than 120.000 tons/year in Chile¹. The grape cane can be storage at controlled temperature and humidity. The system enable increase the polyphenolic compounds in the grape cane biomass². The general aim was: "To enhance the use of waste from the Chile wine industry to obtain extracts rich in stilbenes and procyanidins for future applications as functional compounds in food industries".



METHODOLOGY



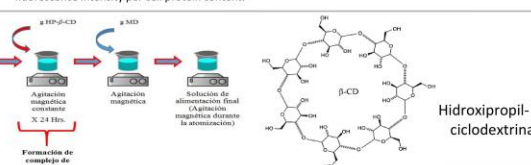
HPLC-DAD-ESI-MS/MS

- Kromasil C18 100A 250 x 4,6 mm, 5 µm column.
- 30°C; Mobile phases A) 0,1% formic acid and B) 100% acetonitrile, using gradient.
- MS/MS detection: negative ionization at 450°C.
- PDA detection: 280 nm-flavan-3-ols, 306 nm-stilbenoids and 360 nm-flavonols.

Antioxidant Assays

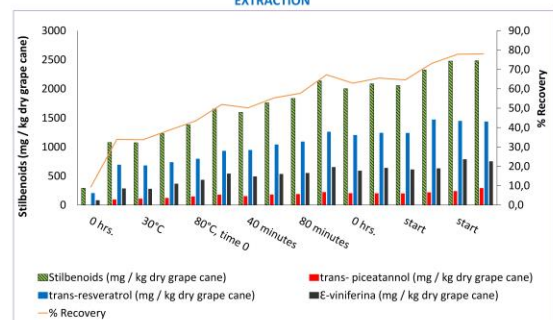
TEAC, CUPRAC and ORAC-FL were carried out in microplate using ABTS cation radical, Cu²⁺(CN)₂ and Fluorescein as probes. The results were expressed as TROLOX equivalents.

ROS detection using DCF-DA probe: ECV-304 endothelial cells were cultivated using 199 medium supplemented with 10% SBF in 5% CO₂ atmosphere. Cells were incubated with several samples dilution during 24 h and DCF-DA (5 µM) solution probe was added by 30 min. Fluorescence emission was measured using 485 nm excitation wavelength and 540 nm emission wavelength. Result was expressed as DCF fluorescence intensity per cell protein content.



RESULTS

1. RECOVERY OF STILBENOIDS BY FOLLOWING ALL PROCESS EXTRACTION



3. ANTIOXIDANT CAPACITY: CELL-FREE AND CELL-BASED ASSAYS

	Pilot scale extract (mgL ⁻¹)	Product: Resveravid® (mgL ⁻¹)	
TEAC CUPRAC	2719 ± 240.3	423 ± 0.6	µmol TE/g
TEAC ABTS	7885 ± 233.6	1041 ± 74.2	µmol TE/g
ORAC-PGR	100 ± 7.0	12,4 ± 34.6	µmol TE/g
ORAC-FL*	14760 ± 659	952 ± 51.8	µmol TE/g

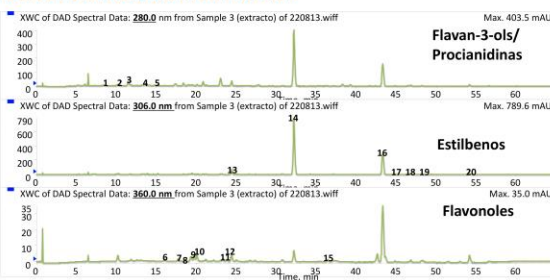
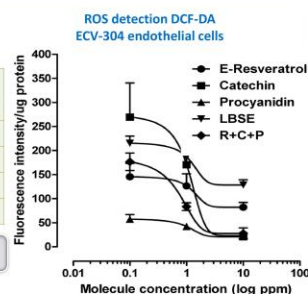
ACKNOWLEDGMENTS

Associated Companies

2. CHEMICAL CHARACTERIZATION: GRAPE CANE EXTRACT AT PILOT SCALE

	w/w (%)
Total stilbenoids	5.45
piceatannol	0.26 ± 0.01
trans-E- resveratrol	3.02 ± 0.02
trans-E- viniferin	1.19 ± 0.04
Others	0.98
Flavan-3-ols/ Procyanidins	6.95
Total sugars	27.5 ± 0.1
Total lignin	38.7 ± 1.4
Proteins	6.7 ± 0.1
Total metals	0.006

ROS detection DCF-DA ECV-304 endothelial cells



CONCLUSIONS

The dry extract obtained under optimal conditions (T:80 °C, t:100 min, ratio S/L:1:10) showed, a yield of 2.4 g stilbenoids/kg of dry grape cane and total stilbenoids concentration was 5.45% w/w. The antioxidant capacity (ORAC-FL) was high 14760.66 µmol trolox equivalent/g of extract. On the other hand, the antioxidant activity of the extract is higher than a commercial product of resveratrol (Resveravid®). Finally, grape cane is a interesting raw material, and of high availability for the development of novel additives for food Chilean industry.

REFERENCE

- 1-Vergara, C. et al., 2012. Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 929-933.
- 2-Mardones C., von Baer D., Vergara C., Fuentealba C., Escobar D., Riquelme S. Un procedimiento para aumentar el contenido de estilbenos, esencialmente resveratrol, en sarmientos provenientes de las podas de *Vitis vinifera*, INAPI-CHILE CL201400341

8.3.7 Otros congresos previos

7. Mardones, C.; Sáez, V.; von Baer, D.; Vergara, C.; Gómez, C.; Ortega, E.; Luengo, J.; **Escobar, D.**; Riquelme, S. “Topical oily formulation of a grape cane extract: Determination of free active compounds and antioxidant capacity”. Resveratrol 2017 Regional Meeting, 11 al 14 octubre, Mendoza, 2017.
8. Riquelme, S.; Mardones, C.; von Baer, D.; Vergara, C.; **Escobar, D.**; Troncoso, M. “Evaluation of stilbenoid and procyanidin extraction processes from grape cane, scalable as industrial process, with focus on the enrichment of products”. Resveratrol 2017 Regional Meeting, 11 al 14 octubre, Mendoza, 2017.
9. García D.E. **Escobar D.**, Physicochemical properties of modified polyphenols from radiata pine as functional building-blocks for biomaterial design. I&S WORKSHOP. Insights and strategies towards a bio-based economy, Uruguay, Montevideo, 2016.
10. **Escobar D.**, García D.E., Esterified lignin from *Pinus radiata* as multifunctional polycarboxylic building-blocks. I&S WORKSHOP. Insights and strategies towards a bio-based economy, Uruguay, Montevideo, 2016.
11. **Escobar D.**, Riquelme S., Vergara C., von Baer D., Mardones C., Stilbenoids and procyanidins enriched extract from grape cane *Vitis vinífera* (Pinot Noir) and separation by using a macroporous resin. I&S WORKSHOP. Insights and strategies towards a bio-based economy, Uruguay, Montevideo, 2016.
12. **Escobar D.**, García D.E., Antimicrobial activity of modified/unmodified polyflavonoids and lignin from *Pinus radiata* obtained under pilot-plant scale. 13th Pacific Rim Bio-Based Composite Symposium, Chile, Concepción, 2016.
13. Riquelme S., **Escobar D.**, Vergara C., von Baer D., Mardones C., Preliminary study of fractionation and purification of stilbenes from extract of *Vitis vinífera* (Pinot Noir) grape cane by macroporous sorption resins (XAD-7). 13th Pacific Rim Bio-Based Composite Symposium, Chile, Concepción, 2016.
14. **Escobar D.**, Riquelme S., Vergara C., Fuentealba C., Bustamante L., von Baer D., Mardones C. Extract from grape cane under pilot scale condition: chemical characterization and antioxidant capacity, 3^{er} Congreso Iberoamericano sobre Biorrefinerías (CIAB), 4^{to} Congreso Latinoamericano sobre Biorrefinerías y 2^{do} Simposio Internacional sobre Materiales Lignocelulósicos, Chile, Concepción, 2015.
15. Riquelme S., **Escobar D.**, Vergara C., Fuentealba C., Bustamante L., von Baer D., Jara P., Lamperti L., Mardones C. Bench-scale extraction of stilbenoids and other phenolics from grape canes: process optimization, chemical characterization, and antioxidant capacity, Resveratrol Regional Meeting, Francia, Dijon, 2015.
16. Avendaño J., Gómez C., Luengo J., Mardones C., Sáez V., Vergara C., von Baer D., Riquelme S., **Escobar D.**, Formación de complejos de inclusión ciclodextrina-estilbenos extraídos de residuos de poda de *Vitis vinífera*, XV Congreso Estudiantes Farmacias, Chile, Valparaíso, 2015.

17. Peredo K., **Escobar D.**, Vega-Lara J., and Miguel Pereira. "Characterization of Low Molecular Weight Xylans Modified By Heterogeneous and Homogeneous Esterification". 3rd Symposium on Biotechnology Applied to Lignocelluloses Lignobiotech III, Chile, Concepción, 2014.
18. Mardones C, Saez V, Apablaza E, von Baer D, Vergara C, Riquelme S, **Escobar D**, Fuentealba C, Berg A, Lamperti L, Jara P. "Characterization of industrially defatted *V. vinifera* grape seeds as a source of procyanidins with antioxidant capacity" 14th International Congress of Ethnopharmacology, VIII Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, Chile, Puerto Varas 2014
19. **Escobar D**, Bustamante L., Riquelme S., Ruiz M.A., Jara P., von Baer D, Lamperti L., Fuentealba C., Vergara C., Berg A., Mardones C. "Phenolic compounds and antioxidant capacity of grape cane extract produced at bench scale" 14th International Congress of Ethnopharmacology, VIII Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, Chile, Puerto Varas 2014.
20. **Escobar D.**, Riquelme S., Fuentealba C., von Baer D., Vergara C., and Mardones C. "Extracción de compuestos fenólicos de interés comercial a partir de residuos vitivinícolas" XIX Congreso Chileno de Ingeniería Química, Chile, Concepción, 2014.
21. Herrera C., Bustamante L., Ruiz A., Riquelme S., von Baer D., Jara P., Lamperti L., **Escobar D.**, Fuentealba C. and Mardones C. "Grape cane extracts: a rich source of stilbens with antioxidant capacity". VI Symposium of Polyphenols and Health Argentina, Buenos Aires 2013.