



UCA
Universidad
de Cádiz



Facultad de Ciencias
<http://ciencias.uca.es>

Biotecnología
Enología
Ingeniería Química
Matemáticas
Química

Trabajo de Fin de Grado

Empleo de CO₂ supercrítico como tecnología para reducir el contenido en sulfuroso en mostos de uva

Pablo Jesús Pérez Hernández

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias

Curso 2021/2022

Departamento: Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos

Tutores: Cristina Cejudo Bastante y Ana Belén Díaz Sánchez

PROPUESTA DE TFG ASIGNADA

Titulación: GBT

Título: Empleo de CO₂ supercrítico como tecnología para reducir el contenido en sulfuroso en mostos de uva (nueva propuesta)

Curso: 2021/2022

Tutor 1: cristina.cejudo@gm.uca.es (INGENIERÍA QUÍMICA Y TEC. DE ALIMENTOS)

Tutor 2: anabelen.diaz@uca.es (INGENIERÍA QUÍMICA Y TEC. DE ALIMENTOS)

Carácter: Trabajos de iniciación a la investigación

Descripción:

La industria alimentaria busca tecnologías de conservación alternativas a los tratamientos térmicos, que respeten la materia prima de partida en términos nutricionales y organolépticos, al mismo tiempo que intervenga en su estabilización. El mosto de uva es una materia prima muy sensible a alteración por su población microbiológica inicial, su alto contenido de azúcares, y la presencia de enzimas oxidásicas. En productos enológicos, el sulfuroso es el aditivo más utilizado para limitar la oxidación y alteración microbiológica, aunque la búsqueda de aditivos alternativos está en continuo objeto de estudio, debido a la capacidad del sulfuroso de producir reacciones alérgicas. En ese sentido, los tratamientos de conservación no térmicos como son los campos pulsantes, ultrasonidos, o altas presiones hidrostáticas, están comenzando a investigarse y a aplicarse en matrices enológicas con distintos propósitos, como la inactivación microbiológica y enzimática para garantizar la estabilidad en el tiempo. El CO₂ supercrítico ha sido utilizado en la preservación de algunos zumos de frutas con buenos resultados, ya que las altas presiones modifican las membranas celulares de los microorganismos provocando su inactivación y la atmósfera inerte que ofrece el CO₂ permiten una mínima alteración organoléptica. En el presente trabajo se pretende evaluar el efecto del CO₂ supercrítico en la inactivación microbiológica y enzimática de mostos de uva blanca, para proponerlo como alternativa al uso de sulfuroso o contribuir a su reducción. Se analizarán también los efectos químicos y organolépticos de los vinos resultantes de la vinificación de los mostros tratados en función de los distintos parámetros de operación, como la presión, temperatura o el % de CO₂ utilizado.

Alumno propuesto: Pablo Jesús Pérez Hernández pablojesus.perezhernandez@alum.uca.es

Curso: 2021/2022

Fecha: 01/11/2021 11:28:51

Es propuesta de alumno: NO; **0 Aceptada profesor:** SÍ; **Aceptada depto.:** SÍ; **Aceptada comisión:** SÍ.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este Trabajo de Fin de Grado, y de mis cuatro años en el Grado de Biotecnología en la Universidad de Cádiz, no hubiera sido posible sin el apoyo de aquellas personas que han estado siempre ahí conmigo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutoras, Cristina y Ana, la oportunidad de realizar este Trabajo de Fin de Grado en su departamento. Gracias por tener paciencia y por ayudarme en este pequeño tramo de mi largo aprendizaje. Hay tiempo, poco a poco se puede conseguir todo.

Gracias a mis padres, María José y Alejandro, por estar a mi lado a pesar de la distancia, por su increíble esfuerzo como padres al brindarme con la educación que tengo, por permitir que su hijo pueda ser feliz. Sin vosotros no sería quien soy hoy en día.

Quiero agradecer a mis dos tréboles, Andrés y Mari, la segunda familia que me habéis dado. Gracias por tratarme como uno más, por preocuparos por mí y por cuidarme ante cualquier adversidad. Espero que nunca nos separemos.

Por último, agradecer a todos aquellos que trato como amigos. A los de siempre, Manuel Ángel, Elisa, Paula y Paloma, que aunque nos veamos un par de veces al año, sabemos que estamos ahí y que nuestra relación se mantiene fuerte. A los de clase, en especial a Elisa y Elena, por esos momentos de risas nerviosas y de felicidad cuando todos conseguíamos seguir adelante como grupo, sin dejar a nadie atrás. A los que me apoyan sin dar nada a cambio, animándome y no dejándome caer.

No puedo expresar toda mi gratitud hacia vosotros. Gracias por acompañarme en este camino, os quiero.

Índice

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
3.1. Mosto y vino.....	3
3.2. Empleo de sulfuroso.....	4
3.3. Alternativas emergentes al sulfuroso.....	6
3.3.1. Campos eléctricos pulsados (PEF).....	7
3.3.2. Altas presiones hidrostáticas (HPP).....	8
3.3.3. Ultrasonidos (US).....	8
3.4. Tecnología de los fluidos supercríticos (SCF).....	9
4. Objetivos.....	11
5. Materiales y métodos.....	12
5.1. Materias primas y reactivos.....	12
5.2. Obtención del mosto.....	12
5.3. Tratamiento con CO ₂ supercrítico.....	13
5.4. Caracterización del mosto.....	14
5.4.1. pH.....	14
5.4.2. Acidez.....	14
5.4.3. °Brix y densidad.....	15
5.4.4. Color.....	15
5.4.5. Índice de polifenoles totales (IPT).....	16
5.4.6. Capacidad antioxidante.....	16
5.4.7. Actividad de la polifenoloxidasas.....	17
5.5. Inactivación microbiológica.....	17

5.6. Análisis estadístico	18
6. Resultados y discusión	19
6.1. Caracterización fisicoquímica de los mostos	19
6.1.1. pH y acidez.....	19
6.1.2. °Brix y densidad	20
6.1.3. Color.....	21
6.2. Actividad enzimática.....	23
6.2.1. Índice de polifenoles totales y capacidad antioxidante	23
6.2.2. Inactivación de la polifenoloxidasas	25
6.3. Inactivación microbiológica	26
7. Conclusiones	28
8. Perspectivas futuras	29
9. Bibliografía	30

1. Resumen

El mosto o zumo de uva es un producto de gran interés por sus muchas propiedades nutricionales, incluyendo sus cualidades anticancerígenas, antibacterianas y antioxidantes. Puede ser consumido como tal o bien ser transformado en vino, destacando ahí su gran interés para la industria alimentaria. Sin embargo, es un producto que fácilmente sufre alteraciones no deseadas desde el inicio del procesamiento para su obtención, como es el pardeamiento causado por la enzima polifenoloxidasas (PPO) presente en la uva. La adición de sulfuroso (SO_2), que actúa como antioxidante y antimicrobiano, es una práctica vitivinícola muy habitual. No obstante, la preocupación de los consumidores por los efectos adversos que puede originar, como reacciones alérgicas y dolores de cabeza, ha aumentado en los últimos años. Por ello, resulta de gran interés la búsqueda de alternativas a su empleo, como es el caso del tratamiento con CO_2 supercrítico (scCO_2).

En este Trabajo de Fin de Grado se aplicó el tratamiento con scCO_2 sobre mosto de uva blanca con el objetivo de reducir, o incluso eliminar, la adición de SO_2 , evitando los efectos adversos que puede ocasionar sobre la salud del consumidor. Concretamente, se trataron a 100 bar, 35 °C y 10 g CO_2 /min durante 10 min, muestras de mosto a diferentes porcentajes de volumen de scCO_2 : 10, 40 y 70 %. Para evaluar el efecto del tratamiento sobre dicho mosto, se caracterizó el mismo analizando los parámetros fisicoquímicos de pH, acidez, °Brix, densidad y color. De igual manera, se estudió la inactivación de la PPO tras el tratamiento a través de la medición de su actividad residual (RA), y su efecto sobre el índice de polifenoles totales (IPT) y la capacidad antioxidante de los mostos tratados. Del mismo modo, se estudió la inactivación microbiológica a través del recuento de las unidades formadoras de colonia por mililitro en diferentes medios de cultivo y la determinación del tiempo de reducción decimal (D).

Los resultados obtenidos fueron prometedores debido a que los mostos tratados presentaron una mayor capacidad antioxidante, un aumento del IPT y una disminución de la RA de la PPO. Asimismo, se obtuvo una alta inactivación microbiológica, reflejando el efecto antimicrobiano de la tecnología aplicada. El pH no se modificó tras el tratamiento, sin embargo, los mostos tratados fueron ligeramente menos ricos en azúcares y en acidez, modificaron levemente sus características cromáticas. A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que la tecnología supercrítica, en concreto utilizando CO_2 , representa una opción interesante para la estabilización de zumos de uva, que podría ser también empleada en la estabilización de otros zumos, vinos u otros productos alimentarios.

2. Abstract

Grape juice is a product of great interest for its many nutritional properties, including its anticarcinogenic, antibacterial and antioxidant qualities. It can be consumed as such or transformed into wine, highlighting its great interest in the food industry. However, it is a product that easily undergoes undesirable alterations from the beginning of the processing to obtain it, such as browning caused by the enzyme polyphenol oxidase (PPO) present in the grape. The addition of sulphur dioxide (SO₂), which acts as an antioxidant and antimicrobial, is a very common winemaking practice. However, consumer concern about adverse effects, such as allergic reactions and headaches, has increased in recent years. Therefore, the search for alternatives to its use is of great interest, such as treatment with supercritical CO₂ (scCO₂).

In this Final Degree Project, scCO₂ treatment was applied to white grape juice with the aim of reducing, or even eliminating, the addition of SO₂, avoiding the adverse effects it can have on the consumer's health. Specifically, juice samples were treated at 100 bar, 35 °C and 10 g CO₂/min for 10 min, at different percentages of scCO₂ volume: 10, 40 and 70 %. To evaluate the effect of the treatment on the juice, it was characterised by analysing the physicochemical parameters of pH, acidity, °Brix, density and colour. Likewise, the inactivation of PPO after treatment was studied by measuring its residual activity (RA) and its effect on the total polyphenol index (IPT) and the antioxidant capacity of the treated juices. Similarly, microbiological inactivation was studied by counting colony forming units per millilitre in different culture medium and determining the decimal reduction time (D).

The results obtained were promising because the treated juices showed a higher antioxidant capacity, an increase in IPT and a decrease in the RA of PPO. A high microbiological inactivation was also obtained, reflecting the antimicrobial effect of the applied technology. The pH did not change after treatment, however, the treated juices were slightly less rich in sugars and acidity, with a slight modification of the chromatic characteristics. In view of the results obtained, it can be concluded that supercritical technology, specifically using CO₂, represents an interesting option for the stabilisation of grape juices, which could also be used in the stabilisation of other juices, wines or other food products.

3. Introducción

3.1. Mosto y vino

Los alimentos y bebidas fermentadas, a pesar de ser productos secundarios de la civilización, son fundamentales para su desarrollo. Algunos arqueólogos sostienen que las bebidas alcohólicas contribuyeron significativamente a la creatividad de la humanidad, inspirando a nuestros ancestros cazadores y recolectores a domesticar los cereales y las frutas [1]. En concreto, la elaboración de vino o vinificación es una de las técnicas más antiguas del ser humano, llegando a ser actualmente uno de los procesos biotecnológicos más prósperos tanto comercialmente como en tradición e innovación [2].

No obstante, para la obtención del vino se necesita partir del mosto, un producto obtenido por el prensado de la uva y que puede transformarse en un bien que también se comercializa, el zumo de uva. Los zumos de uva están formados por agua (81 %-86 %) y una alta concentración de azúcares (glucosa y fructosa), con una elevada acidez debido a la existencia de ácidos orgánicos. Presentan pequeñas cantidades de minerales, vitaminas y otros compuestos aromáticos fenólicos que aportan características sensoriales a los zumos de uva [3-5]. Entre los compuestos fenólicos están los flavonoles, antocianinas, ácidos fenólicos y el estilbeleno resveratrol [6-8], lo que hace que este producto sea de gran interés es sus efectos positivos para la salud por su eficacia antioxidante, anticancerígena, antibacteriana, antienvjecimiento y antiinflamatoria [8,9].

Por otro lado, el vino es el resultado de una serie de transformaciones bioquímicas provocadas en el mosto de uva por la acción de varias enzimas de diferentes microorganismos, especialmente las levaduras y bacterias lácticas. En la elaboración de vino blanco, la transformación más importante que tiene lugar durante la vinificación es la fermentación alcohólica del mosto, llevada a cabo por las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y que con el consumo de sus azúcares da lugar a la producción de etanol y CO₂ [2]. En la elaboración de vino tinto, además de la fermentación alcohólica se produce la fermentación maloláctica, llevada a cabo por bacterias lácticas como *Oenococcus oeni* que consumen ácido málico para producir ácido láctico y CO₂, suavizando la acidez y consiguiendo una mayor estabilidad microbiológica [10]. En todo el proceso de vinificación, se generan una gran cantidad de subproductos en forma de residuos sólidos, que principalmente están formados por una mezcla del orujo y raspones. Estos subproductos, que suelen desecharse, son una importante fuente de fibra dietética y compuestos fenólicos, con propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Por esta razón, se ha buscado la caracterización de los componentes químicos de estos subproductos para obtener ingredientes de alto valor añadido para su aplicación en la industria alimentaria y, al mismo tiempo, tener beneficios económicos y contribuir a una economía circular [11].

Respecto a los factores de vinificación: la temperatura de fermentación, el pH y la concentración inicial de azúcar del mosto, pueden afectar al crecimiento y la capacidad metabólica de las levaduras [12–14]. Por otro lado, pero en el mismo aspecto, está bastante demostrado el efecto inhibitorio del etanol sobre las tasas de crecimiento específicas y la viabilidad de *S. cerevisiae*. [15,16]. Otros factores de estrés conocidos que también se dan durante la fermentación del vino son la presencia de altos niveles de CO₂ y anhídrido sulfuroso (SO₂), a pesar de que este último se emplee de habitualmente [17].

3.2. Empleo de sulfuroso

El deterioro microbiológico del mosto y del vino puede ocurrir tanto en el entorno natural debido a infecciones como son las causadas por el hongo *Botrytis cinerea*, en el contacto con los equipos de vinificación, durante la propia vinificación o bien después de esta [18] además de por otras bacterias alterantes como acéticas [19] o lácticas [20]. Asimismo, es crucial comprender las consecuencias que puede generar un crecimiento microbiológico indeseable, como los malos sabores, los olores y los cambios de color asociados a la condición específica de deterioro [18].

Ya desde las primeras etapas de vinificación el mosto queda expuesto a alteraciones. En el molturado de las uvas empiezan a ocurrir reacciones de oxidación causadas por la polifenoloxidasas (PPO), enzima procedente principalmente del hollejo, y que se asocia a reacciones de pardeamiento indeseable. Su principal función es la de catalizar dos reacciones distintas: la hidroxilación de los monofenoles a o-difenoles (actividad monofenolásica) y la oxidación de los o-difenoles a o-quinonas (actividad difenolásica) [21]. Las quinonas formadas son sustancias altamente reactivas, que normalmente reaccionan con otras quinonas, aminoácidos o proteínas para producir compuestos coloreados que causan el deterioro de la calidad de los alimentos al cambiar sus propiedades nutricionales y organolépticas [22,23], haciendo que disminuya significativamente la aceptación del consumidor, la vida de almacenamiento y el valor de los productos.

De estos inconvenientes microbiológicos y enzimáticos nace la necesidad del uso del SO₂. El SO₂ es uno de los compuestos más antiguos utilizados en la industria alimentaria y de bebidas principalmente por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas [18]. Una vez que el SO₂ se añade al mosto, vino o a cualquier solución acuosa, este actúa como un ácido débil y sigue un equilibrio químico entre tres especies moleculares según el pH de la disolución: SO₂ molecular (SO₂ · H₂O), bisulfito (HSO₃³⁻) y sulfito (SO₃²⁻). Como se puede observar en la **Figura 1**, el SO₂ molecular es más frecuente de pH 0 a 2 (pK₁=1.81), el anión bisulfito de pH 2 a 7 (pK₂=6.91) y el sulfito de pH 7 a 10. En general, el pH de los mostos y vinos varía entre 3 y 4, por lo que la especie de SO₂ dominante en el vino es el anión bisulfito HSO₃³⁻. [24]. La principal especie implicada en la acción antioxidante del SO₂ es el HSO₃³⁻, mientras que es muy poco probable que

se produzca una interacción directa del SO_2 con el oxígeno [25]. El HSO_3^- reacciona tanto con las quinonas, reduciéndolas a hidroquinonas, como con el peróxido de hidrógeno, inhibiendo así la reacción de Fenton (oxidación que origina radicales altamente reactivos del hidroxilo) [25,26].

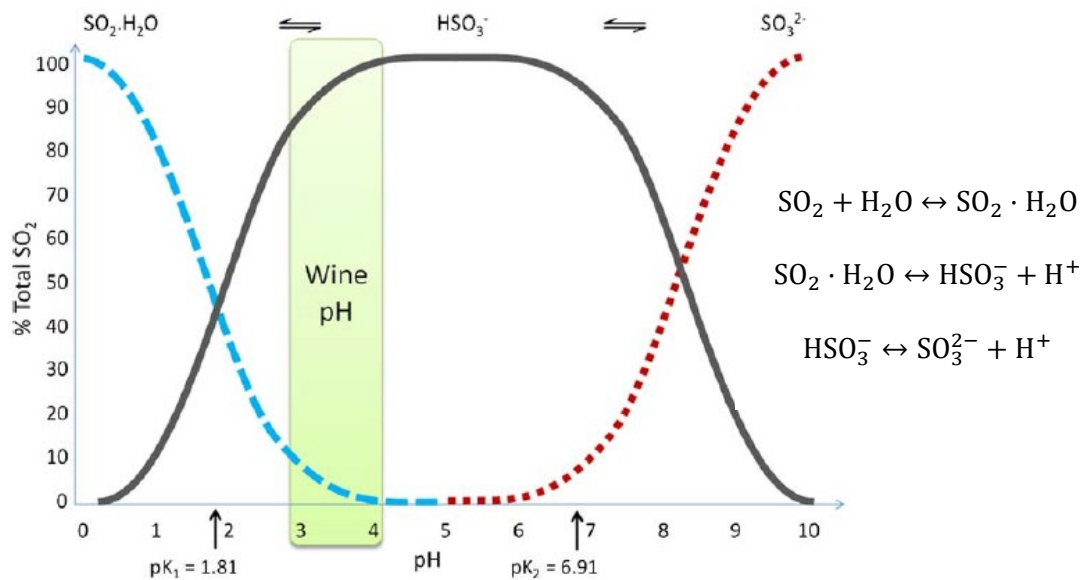


Figura 1. Especies de SO_2 en disolución acuosa y su representación en porcentaje del SO_2 total en todo el rango de pH. pK_1 es la constante de disociación de la reacción química $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HSO}_3^- + \text{H}^+$ y pK_2 la de la reacción química $\text{HSO}_3^- \leftrightarrow \text{SO}_3^{2-} + \text{H}^+$. El rango de pH del vino queda sombreado [27].

La adición de SO_2 es un proceso delicado, ya que la concentración añadida a las diferentes etapas de la vinificación debe ser suficiente para inhibir el desarrollo de las especies de deterioro no deseadas, pero no las levaduras que realizan la fermentación alcohólica o las bacterias lácticas responsables de la fermentación maloláctica, en el caso que se desee que esta última se realice [18]. Además, en los últimos años los productores han sentido la necesidad de reducir o eliminar el uso de sulfuroso, para así aumentar la imagen de naturalidad de los vinos, pero también para evitar daños a la salud de los consumidores sensibles a la presencia del mismo ya que se estima que en torno al 1 % de la población es sensible a los sulfitos [28,29]. Estos efectos adversos consisten, concretamente, en reacciones alérgicas, dolores de cabeza, asma, dermatitis, dolor abdominal, diarrea y broncoconstricción. Dado que el SO_2 es un conservante comúnmente utilizado en la industria del vino, también es importante considerar el efecto acumulativo que tiene en el consumidor [30]. En cualquier caso, la Organización Mundial de la Salud ha fijado el límite de seguridad para la ingesta diaria de sulfitos en 0.7 mg/kg de peso corporal [31]. En el mismo sentido, la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) recomienda un máximo de 150 mg/L de SO_2 para vinos tintos y de 200 mg/L para vinos blancos y rosados [32], mientras que la Unión Europea, con el Reglamento Delegado (UE) 2019/934, limita el máximo total de SO_2 a 160 mg/L para los vinos tintos y 210 mg/L para los vinos blancos y rosados [33]. Además, según el Reglamento (UE) n° 1169/2011, el SO_2 y las diversas formas de sulfitos, deben ser

etiquetados con códigos (números E) en el rango E-220 a E-228, junto con la obligación de etiquetar con la frase "contiene sulfitos" los productos alimentarios, incluido el vino, en los que la concentración de SO₂ sea superior a 10 mg/L o 10 mg/kg [34].

En la última década, el uso de SO₂ en la industria alimentaria ha suscitado cierta preocupación por la seguridad de los consumidores. El simple hecho de etiquetar con la frase "contiene sulfitos" provoca cierta preocupación entre los consumidores que, en general, se orientan cada vez más hacia productos "saludables" sin conservantes químicos [35,36]. Para poder lograr reducir o eliminar el contenido en SO₂ en la elaboración de vino, se han estudiado tecnologías realmente innovadoras que así lo permiten, reservando su uso para un papel antiséptico y antioxidante sólo en el embotellado del vino, donde pueden garantizar, incluso a dosis muy bajas, una prolongación de la vida útil del producto [37].

3.3. Alternativas emergentes al sulfuroso

Aunque actualmente no existe ninguna sustancia química que pueda sustituir al 100 % el uso de sulfuroso, existen diversas investigaciones que pretenden, al menos, ayudar a reducir su cantidad con ayuda de otros aditivos que ejerzan igualmente acción antioxidante y antibacteriana. Algunas alternativas químicas al SO₂ son el dicarbonato de dimetilo (DMDC), las lisozimas y el ácido ascórbico. El DMDC inhibe los microorganismos al reaccionar con los grupos aminos de los sitios activos de las enzimas celulares [38], pero no es muy eficaz sin SO₂ presente [39]. La lisozima inhibe los microorganismos mediante la hidrólisis de los enlaces β-1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetil-D-glucosamina en las paredes celulares, aunque se ha reportado su baja efectividad en el control de las acetobacterias [40]. Además, puede disminuir la intensidad del color por la formación de un precipitado [41], factor que hay que tener muy en cuenta sobre todo en la elaboración de vinos tintos. El ácido ascórbico ejerce su acción eliminando el oxígeno molecular oxidándose él mismo, protegiendo a otros constituyentes oxidables del vino, como los compuestos fenólicos, y evitando la formación de las o-quinonas de color parduzco. Sin embargo, la adición de ácido ascórbico requiere siempre otra de SO₂ para eliminar el peróxido de hidrógeno formado en su oxidación [42].

Por otro lado, además de los aditivos químicos, también están adquiriendo relevancia los tratamientos físicos con la finalidad de mejorar las características organolépticas de los productos, al mismo tiempo que inactivar las enzimas y los microorganismos responsables de la alteración de mostos y vinos. Actualmente hay algunos tratamientos permitidos por la OIV como la flash pasteurización del vino. Este tratamiento permite la destrucción por calor de las formas vegetativas de los microorganismos, que son las únicas presentes en el pH de los vinos. Para garantizar esta estabilización microbiana, la temperatura del tratamiento es de unos 70 °C y el tiempo de 20 segundos [43]. No obstante, la flash pasteurización, y la mayoría de los procesos

térmicos, tiene dos grandes desventajas debido al uso de altas temperaturas: presentan un elevado consumo de energía y puede existir pérdida de volátiles y polifenoles, que son responsables de la calidad sensorial de los vinos [44]. Por ello, la aplicación de tecnologías físicas para producir, envejecer y conservar el vino, así como la preservación del mosto de partida como producto, es un área de gran interés [30]. El nuevo reto para la industria alimentaria a nivel mundial en los próximos años es la inversión, el desarrollo y la implementación del procesamiento no convencional basado en tecnologías no térmicas y emergentes, como campos eléctricos pulsados (Pulsed Electric Fields - PEF), las altas presiones hidrostáticas (High Pressure Processing - HPP), los ultrasonidos de potencia (Ultrasounds - US) o el dióxido de carbono supercrítico (Supercritical Fluids - SCF).

3.3.1. Campos eléctricos pulsados (PEF)

Los PEF son una alternativa prometedora para la conservación del vino principalmente porque funciona en modo continuo, lo que facilita la integración en los procesos industriales existentes. En su funcionamiento, se aplican pulsos cortos de microsegundos de alta intensidad de campo eléctrico a las bebidas que son bombeadas y fluyen entre dos electrodos [30,45]. A través de los PEF se consigue inactivar los microorganismos indeseables, a menudo sin ningún efecto significativo en la calidad de la bebida [45,46]. La inactivación microbiana se produce debido a la formación de una diferencia de potencial a través de las membranas celulares microbianas, lo que provoca la permeabilización o electroporación de la membrana celular que conlleva a la pérdida de fluidos intracelulares y a la muerte celular [47].

Dependiendo de la aplicación, se puede tener un consumo de energía relativamente bajo en comparación con otras tecnologías de conservación de alimentos [48]. Sin embargo, la mayoría de los autores han informado de un aumento de la temperatura asociado al incremento de la intensidad o energía del campo eléctrico de tratamiento [45]. Aunque este incremento de la temperatura también aumente la tasa de inactivación al mejorar la fluidez de la membrana celular y la transferencia de masa, no es deseable para el vino, por lo que deben seleccionarse las condiciones de tratamiento adecuadas para garantizar un proceso no térmico [47].

Además, los PEF también tiene otras aplicaciones en la producción de vino a parte de la conservación. Algunos autores han afirmado que, con ciertos pulsos con una carga específica, han sido capaces de producir vinos con un alto contenido fenólico y mayor intensidad de color [49] que puede utilizarse posteriormente incluso para elaborar vinos tintos de alta calidad con crianza en roble [50].

3.3.2. Altas presiones hidrostáticas (HPP)

Las HPP son una tecnología moderna comercial no térmica que puede utilizarse para prolongar la vida útil mediante la inactivación de levaduras, mohos y bacterias patógenas en el vino, la cerveza, zumos, alimentos sólidos y otros productos mediante la aplicación de presiones isostáticas uniformes, normalmente entre 100 y 600 MPa [51,52]. La inactivación microbiana se atribuye principalmente a la perforación de las membranas celulares y la desnaturalización de las proteínas [53,54]. La mayoría de las unidades de HPP funcionan en discontinuo, pero la industria ha conseguido desarrollar unidades semicontinuas para productos bombeables. Debido a que la HPP es independiente de la forma y el tamaño del producto, el escalado hasta el tamaño comercial es relativamente sencillo [55]. De hecho, en España está bastante extendido su aplicación industrial en la industria cárnica, en empresas como Espuña, Campofrío, Argal o Noel [56].

En vino tinto de variedad Nero D'avola Syrah, Tao et al. [57] declararon que el tratamiento de HPP realizado a 650 MPa durante 15 minutos no produce ningún cambio en la calidad sensorial global ni en 11 atributos sensoriales. El mismo estudio encontró que el contenido fenólico total, los ésteres tartáricos, los flavonoles y los taninos disminuyeron cuando el vino fue sometido al mismo tratamiento. En cuanto al estudio realizado por Santos et al. [58] en el vino blanco de la variedad Encruzado, no se detectó ninguna diferencia organoléptica entre el vino no tratado y el tratado a 500 MPa durante 5 minutos, además no se observó ningún efecto sobre la actividad antioxidante y el contenido fenólico total del vino blanco.

3.3.3. Ultrasonidos (US)

Los US son una tecnología no térmica con potencial para ser utilizada como técnica de conservación del vino. Pueden trabajar tanto en modo discontinuo como continuo, con la necesidad de utilizar camisas de refrigeración para controlar la temperatura durante el procesamiento [59,60]. A través de la conversión de la corriente en vibraciones mecánicas, se generan pequeñas burbujas que acaban colapsando. Esto provoca un fenómeno de cavitación, originando zonas de hasta 5,000 K y 50,000 kPa con radicales hidroxilo [61]. En este caso, los microorganismos se inactivan por la alteración de sus membranas al interaccionar con las zonas de alta energía, haciéndolas más sensible a los radicales hidroxilo. Además, de la inactivación microbiológica, se ha comprobado que los US también son útiles para la inactivación de enzimas responsables del deterioro de los alimentos, como las PPO [60,62]. La eficacia de los US depende de la viscosidad, la presión de vapor y la tensión superficial de la muestra líquida tratada, así como la forma, tamaño y especie del microorganismo para su inactivación [63,64].

Los usos potenciales de los US en la industria del vino incluyen la crianza, la mejora de la fermentación, el saneamiento de barricas y equipos, y la extracción de compuestos aromáticos y

fenólicos bioactivos de las uvas y el mosto. Los US también puede utilizarse para mejorar la penetración del vino en la estructura de las barricas de roble, mejorando los sabores a vainilla, caramelo, crema y tierra [30]. Con respecto a su aplicación en vino tinto, Singleton et al. [65] afirmaron que los US a 90 kHz durante 60 minutos en contacto directo con el vino aumentaban la concentración de taninos y cambiaba la percepción gustativa. Por otro lado, la aplicación de un tratamiento indirecto del vino en un baño de ultrasonidos a 30 kHz con 20 kPa durante un período prolongado de 10 días dio lugar a un aumento de la concentración de antocianos y a una disminución del parámetro de color L^* (luminosidad) [66]. Por último, también se estudió su efecto sobre vino blanco empleando 90 kHz y 35 W durante 60 minutos, produciendo un aumento de la concentración de taninos, así como a la generación de un sabor desagradable a "quemado" [65].

3.4. Tecnología de los fluidos supercríticos (SCF)

La innovación de los productos alimentarios tiene un papel importante para mejorar la competitividad de la industria alimentaria. Las grandes industrias sólo se resisten a los cambios en el mercado alimentario a través de innovaciones en sus sistemas de producción proporcionando productos seguros y de alta calidad con propiedades nutricionales y sensoriales preservadas similares a los alimentos no procesados [67]. Igualmente, es importante desarrollar tecnologías alternativas con un impacto medioambiental mínimo: la reducción del consumo de energía, la conversión eficiente de los reactivos en productos junto con la disminución de los residuos tóxicos y los subproductos, y la mayor calidad y seguridad de los productos finales son requisitos cruciales para estos procesos innovadores. Por consiguiente, las tecnologías de alta presión han demostrado ser herramientas relativamente nuevas que pueden llegar a satisfacer estas demandas [68,69]. Entre otras muchas aplicaciones tecnológicas, la tecnología de los fluidos supercríticos, en concreto utilizando CO_2 , ha surgido como una tecnología potencial para el procesamiento no térmico de zumos de frutas y verduras [70,71].

Los fluidos supercríticos son sustancias puras que se encuentran por encima de su temperatura y presión críticas. En la fase supercrítica, estas sustancias presentan ciertas ventajas en relación con otras fases termodinámicas (sólido, líquido y gas), ya que en ese punto sus propiedades físicas y químicas se encuentran entre la fase líquida y la gaseosa. Dentro de sus principales ventajas está la posibilidad de ajustar las propiedades termofísicas, como la viscosidad difusiva, la densidad y la constante dieléctrica, simplemente variando levemente la presión y/o la temperatura. Además, tienen excelentes propiedades de transferencia de calor y pueden utilizarse como fluidos de transferencia de calor con un impacto prácticamente nulo sobre el medio ambiente al compararse con los métodos convencionales. Debido a la ausencia de tensión superficial que presentan, existe una rápida penetración en células, partículas y estructuras poliméricas, haciendo función de

transporte y originando diversas aplicaciones, [72,73] como la extracción de compuestos fitoquímicos [74], ingeniería de partículas cargadas con sustancias biológicamente activas [75], impregnación de compuestos de interés en matrices poliméricas [76] y la inactivación microbiana y enzimática [77].

Como ya se ha comentado, entre los fluidos supercríticos el CO_2 (scCO_2) es el más utilizado por sus diferentes aplicaciones en varios campos debido a sus propiedades. Su punto crítico se alcanza fácilmente (73.8 bar y 31.1 °C), permitiendo el desarrollo de procesos no térmicos. Otras ventajas es ser inerte a las reacciones de oxidación, no ser inflamable ni corrosivo, no ser tóxico, ser un disolvente GRAS (generalmente reconocido como seguro) y tener un bajo coste por estar disponible de forma natural en la atmósfera. En la **Figura 2** se representa su diagrama de fases [80].

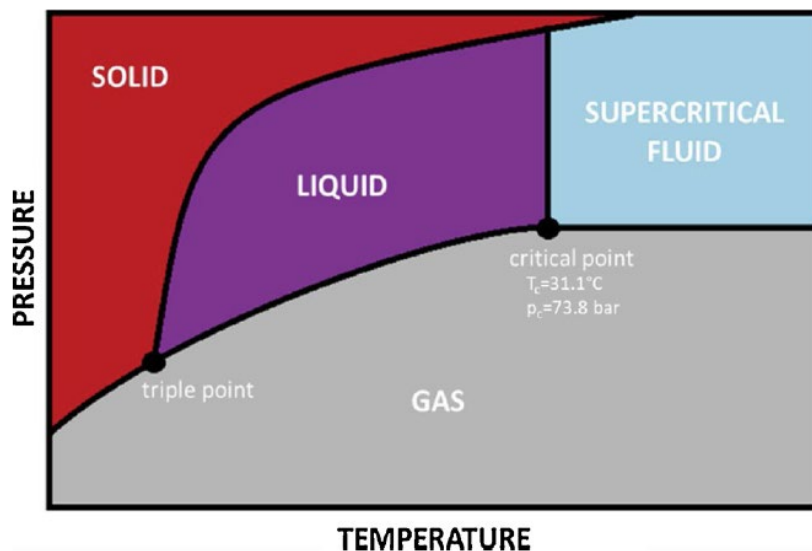


Figura 2. Diagrama de fases del CO_2 [72].

Existe literatura muy reciente sobre la producción de zumos de frutas y verduras aplicando un tratamiento de scCO_2 . Estos estudios declaran que el procesamiento con scCO_2 es capaz de inactivar microorganismos y enzimas en productos alimentarios líquidos de forma no térmica, incluso utilizando condiciones de temperatura suaves. [78] Un ejemplo es el tratamiento a 100 bar y 35 °C durante 15 minutos en zumo de kiwi y melocotón, demostrando ser una técnica innovadora para pasteurizar, que no modifica las cualidades fisicoquímicas y organolépticas del producto fresco [79]. Asimismo, existen estudios de aplicación de scCO_2 en zumo de uva, como el de Amaral et al. [80], pero la mayoría se centran en zumo de naranja [81,82] y de manzana [83,84]. Por tanto, la intención del presente estudio consiste en extender la potencialidad del scCO_2 a un producto tan sensible como es el zumo de uva.

4. Objetivos

En el grupo de investigación de “Análisis y diseño de procesos con fluidos supercríticos” se ha comenzado a trabajar en el análisis de las variables de operación del tratamiento con CO₂ supercrítico en las características de los mostos tratados obtenidos a partir de uva de mesa. Sin embargo, la optimización de estas condiciones puede variar según la variedad de uva empleada, siendo importante optimizar el proceso cuando va a tratarse una uva de vinificación.

El objetivo general del presente trabajo consiste en estudiar la efectividad del tratamiento con CO₂ supercrítico en mosto de uva en relación a la mejora de su conservación, haciendo hincapié en la variable más influyente del proceso, concretamente el porcentaje de CO₂ utilizado en el procesamiento.

Para evaluar este objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos:

- a. Analizar la modificación de los parámetros convencionales de caracterización de mostos (pH, acidez, color, °Brix, densidad) al modificar el porcentaje de CO₂.
- b. Determinar la disminución de la actividad enzimática responsable de los fenómenos de pardeamiento, así como el IPT y la capacidad antioxidante tras el tratamiento.
- c. Confirmar la disminución de población microbiológica (microbiota aerobia, levaduras y bacterias lácticas) después de la aplicación del tratamiento en distintas condiciones.

5. Materiales y métodos

5.1. Materias primas y reactivos

El dióxido de carbono (99.99 %) fue proporcionado por Abello-Linde S.A. (Barcelona, España). El etanol, la triptona, la peptona bacteriológica, la glucosa y la fenolftaleína (1 %) fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España). El 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), el fosfato de sodio monobásico (≥ 99.0 %), el fosfato de sodio dibásico (≥ 99.0 %) y el 1,2-dihidroxibenceno o catecol (≥ 99.0 %) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El extracto de levadura granulado fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania). El agar Bacto™ fue suministrado por BD (Nueva Jersey, EE.UU). El hidróxido de sodio microgranular fue suministrado por POCH (Gliwice, Polonia). El caldo MRS fue suministrado por VWR (Lovaina, Bélgica). La uva de la variedad Pedro Ximénez (12.8 % vol. alcohol probable) fue suministrada por la bodega Forlong (El Puerto de Santa María, España).

5.2. Obtención del mosto

Se partió de uva de la variedad Pedro Ximénez (12.8 % vol. alcohol probable) congeladas a -13 °C desde 5 meses antes de su uso. Se procedió a pesar aproximadamente 10 kg de racimos de esta uva y se introdujeron en una cámara de refrigeración a 4 °C hasta el día siguiente para su lenta y correcta descongelación. Posteriormente se realizó la selección y el despalillado manual de los racimos, obteniendo unos 9 kg de uvas despalilladas. Se realizó un molturado manual para facilitar la extracción del mosto y se introdujeron en una prensa vertical manual a escala de laboratorio. La pasta se prensó un total de tres veces, removiéndola antes de cada prensado. Este proceso originó unos 5.5 L de mosto yema, otorgando un rendimiento de 0.61 L/kg.

Ese volumen se encubó en dos depósitos de metacritalo que contenían 2.75 L de mosto cada uno, y a cada depósito se le aplicó una dosis de 1.5 g/hL de Enovin Clar suministrada por Agrovín (Ciudad Real, España) disuelto su peso 10 veces en agua. Se eligió esta dosis ya que se encontraba dentro del rango óptimo marcado por el fabricante. Para evitar cualquier oxidación temprana por acción de luz, ambos tanques se taparon y envolvieron totalmente con papel de aluminio. Por último, se incubaron en una cámara de frío a 4 °C en oscuridad durante 48 h.

Una vez se pudo distinguir claramente el sobrenadante y el precipitado, se realizó el trasiego del sobrenadante o mosto clarificado de ambos depósitos a otro receptáculo para su homogenización. Tras esto, se procedió a la distribución del mosto clarificado en varios botes de plástico previamente autoclavados. Posteriormente se introdujeron en una cámara de congelación a -13 °C hasta la realización de los experimentos microbiológicos y la caracterización del mosto.

5.3. Tratamiento con CO₂ supercrítico

Los experimentos de tratamiento con scCO₂ se realizaron a escala de laboratorio en un equipo SFE100 de alta presión suministrada por Thar Technologies (Pittsburgh, PA, EE.UU.). Este sistema está conformado principalmente por un baño de refrigeración, una bomba P50 de alta presión, un precalentador, un recipiente de 100 mL con camisa termostática y una reguladora de presión posterior (BPR) para controlar la presión del sistema. El diagrama de flujo del proceso se representa en la **Figura 3**.

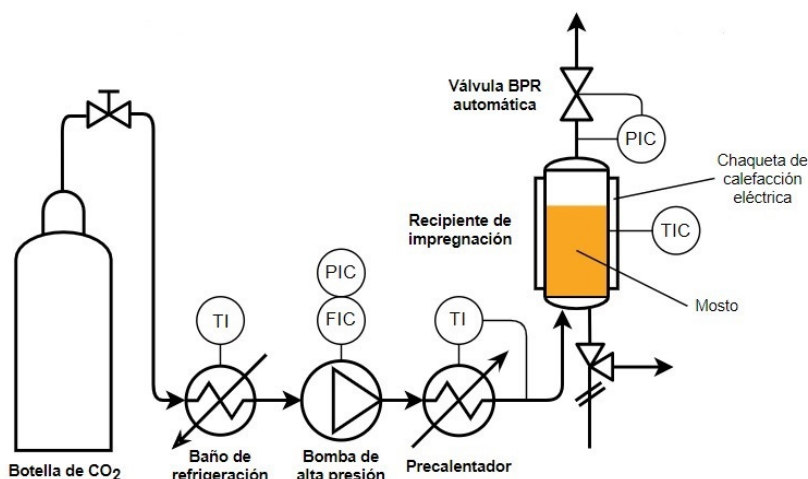


Figura 3. Diagrama de flujo de la planta de tratamiento con SC-CO₂ supercrítico. Creada con Visual Paradigm 16.3.

Previamente a cualquier tratamiento, siempre se realizó una purga del sistema para lograr su estricta limpieza: primero se hizo correr agua para eliminar cualquier azúcar, seguidamente etanol para eliminar el agua y por último CO₂ para expeler algún remanente de etanol. Para realizar el tratamiento, se precalentó con antelación el reactor hasta la temperatura deseada mediante el uso de la chaqueta eléctrica. Posteriormente, se introdujo el volumen de mosto necesario según el porcentaje de scCO₂ y se cerró herméticamente. A continuación, se bombeó el CO₂ al flujo establecido hasta alcanzar el nivel de presión y se empezó a contar el tiempo. Una vez transcurrido este tiempo, se cerró el flujo de scCO₂, se apagó la chaqueta térmica y se aplicó una despresurización muy suave para evitar perder volumen de muestra tratada. Los experimentos se llevaron a cabo en modo discontinuo a un tiempo de tratamiento de 10 min y una presión de 100 bar, 35 °C y flujo de 10 g CO₂/min, que fueron fijados de acuerdo a los resultados obtenidos en experiencias previas. Se planteó un diseño de tres experimentos por triplicado variando únicamente el porcentaje de scCO₂ (10, 40 y 70 %), calculado en función del volumen total del reactor, para evaluar las diferencias obtenidas respecto al mosto control (**Tabla 1**). Los mostos tratados se almacenaron en condiciones de esterilidad en tubos Falcon de 50 mL y en tubos Eppendorf de 1.5 mL que se congelaron a -20 °C hasta su posterior uso.

Tabla 1. Resumen del diseño experimental para el tratamiento de mosto con scCO₂.

Muestra	Parámetros fijos	Volumen mosto (mL)	Volumen CO ₂ (mL)
Sin tratar	-----	100	0
10 % scCO ₂		90	10
40 % scCO ₂	100 bar, 35 °C 10 g/min, 10 min	60	40
70 % scCO ₂		30	70

5.4. Caracterización del mosto

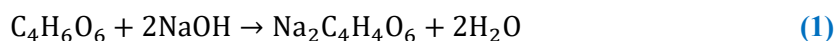
Con el fin de determinar cualquier cambio físico-químico en el mosto tratado con scCO₂, se procedió a realizar una serie de pruebas analíticas. Antes de cada prueba, los mostos se descongelaban en agua y se atemperaban.

5.4.1. pH

Se midió el pH por triplicado de cada mosto tratado a diferente porcentaje de scCO₂ y el del mosto sin tratar en un medidor de pH Basic 20, propiedad de CRISON (Barcelona, España).

5.4.2. Acidez

La determinación de la acidez en mosto se realizó mediante una valoración ácido base con NaOH por triplicado. La acidez se representó a través de la concentración en g/L de ácido tartárico (C₄H₆O₆). Para ello, se empleó una disolución de NaOH 0.1 M exacta valorada con ftalato ácido de potasio 0.1 M. Una vez preparado todo el equipo, en un Erlenmeyer de 100 mL se añadieron 20 mL de mosto, 20 mL de agua destilada y 3 gotas de fenolftaleína. Se procedió a valorar gota a gota de NaOH 0.1 M hasta el que el mosto anaranjado adquiriría un color rosáceo. A través de la estequiometría (1) se estableció una relación entre el C₄H₆O₆ y el volumen de NaOH según la cantidad total de mosto (2).



$$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6 \text{ (g/L)} = \frac{\text{Vol. NaOH (L)} \cdot [\text{NaOH}] \text{ (M)} \cdot \frac{1 \text{ mol C}_4\text{H}_6\text{O}_6}{2 \text{ mol NaOH}} \cdot \frac{150.087 \text{ g C}_4\text{H}_6\text{O}_6}{1 \text{ mol C}_4\text{H}_6\text{O}_6}}{\text{Vol. mosto (L)}} \quad (2)$$

5.4.3. °Brix y densidad

Un aspecto muy importante en el mosto es su cantidad de azúcar (°Brix) necesaria para la fermentación, que se puede relacionar con la densidad del líquido. La medida de los °Brix y la densidad de cada mosto se realizó a través de una inyección en un densímetro electrónico DMA 5000 M, propiedad de Anton Paar (Graz, Austria). Previa a cada inyección, se mantuvo las condiciones de limpieza establecidas: primero se hizo pasar agua y posteriormente etanol hasta su evaporación. Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y siempre a una temperatura de 20 °C, establecida por el equipo.

5.4.4. Color

Otro parámetro importante es el color que presenta el mosto, puesto que este es clave para la elaboración de un vino blanco, tinto o rosado. Se hizo uso del software MSCV (Método Simplificado para el Color de los Vinos) (<https://www.unirioja.es/color/descargas.shtml>) del Departamento de Química de la Universidad de la Rioja (España), que calcula las coordenadas de color en el espacio CIELAB de vinos y brandys utilizando sólo cuatro valores de absorbancia: 450, 520, 570 y 630 nm. Para poder distinguir diferencias visuales entre las muestras sin tratar y las tratadas, así como entre las propias muestras tratadas, se procedió a calcular el ΔE^* que se define como la ecuación (3).

Además, se midieron valores de absorbancia a 420 y 620 nm necesarios para determinar la intensidad colorante (IC) y la tonalidad (T). La IC (4) se define como la intensidad dada por la suma de las absorbancias en cubetas de 1 cm de trayecto óptico para las radiaciones de longitudes de onda iguales a 420, 520 y 620 nm. La T (5), por otro lado, se define como la relación existente entre la absorbancia a 420 y 520 nm. Para ambos parámetros se siguió el método oficial de análisis de la UE [85].

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3)$$

$$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620} \quad (4)$$

$$T = \frac{A_{420}}{A_{520}} \quad (5)$$

Todas estas medidas de absorbancia se realizaron por triplicado, filtrando previamente la muestra con filtros de 0.45 μm en cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico. Se hizo uso del espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU).

5.4.5. Índice de polifenoles totales (IPT)

El índice de polifenoles totales (IPT) es un valor que representa la totalidad de los compuestos polifenólicos de los vinos. La determinación del IPT se realizó con una medida de la absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que escinde el grupo fenol, en una cubeta de cuarzo con una previa dilución 1/10 [86]. Para ello, se volvió a hacer uso del espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU). Cada muestra se analizó por triplicado y se calculó el IPT a través de la ecuación (6), que establece una relación proporcional entre los polifenoles presentes en el vino y su absorbancia.

$$\text{IPT} = \text{Abs}_{280} \cdot \text{Dilución} \quad (6)$$

5.4.6. Capacidad antioxidante

Con el fin de determinar el posible efecto del scCO_2 sobre la capacidad antioxidante del mosto, se usó el método del DPPH. Este compuesto se caracteriza por ser un radical libre estable que posee al menos un electrón desapareado en su orbital más extremo, haciendo que posea una gran actividad de reaccionar con compuestos antioxidantes. Esta deslocalización da lugar al color violeta intenso que se obtiene en disolución en etanol, caracterizado por una banda de absorción en unos 515 nm. Cuando una disolución de DPPH se mezcla con la de una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, se produce la forma reducida y un cambio de color muy notorio: se pierde el violeta intenso y se origina un amarillo pálido debido al grupo picrilo todavía presente, junto con una pérdida de absorbancia a 515 nm [87].

Se siguió el método descrito por Cejudo et al. [88], ajustado a una microplaca de 96 pocillos: se añadieron 293 μL de la disolución de DPPH $6 \cdot 10^{-5}$ M junto con 7 μL de muestra por duplicado. Además, también se añadió a un par de pocillos 293 μL de la disolución de DPPH $6 \cdot 10^{-5}$ M junto con 7 μL de etanol como control del reactivo DPPH. Tras 3 horas, se midió la absorbancia a 515 nm de cada uno de los pocillos utilizando el equipo BioTek Synergy HTX multi-mode reader (Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU)). La actividad antioxidante de cada muestra se expresó a través del porcentaje de inhibición (% I) a partir la expresión (7), donde A_i es la absorbancia del DPPH y A_f la absorbancia del mosto. Se tuvieron en cuenta las interferencias causadas por el etanol.

$$\% \text{ I} = \frac{A_i - A_f}{A_i} \cdot 100 \quad (7)$$

5.4.7. Actividad de la polifenoloxidasas

La PPO es una enzima que se encuentran en la uva que actúan oxidando compuestos fenólicos, generando pardeamiento y pérdida de calidad. Se encuentra en proporciones diferentes, según variedades y condiciones, índice de madurez y, sobre todo, estado sanitario. La principal PPO en las uvas es la tirosinasa [89].

El método empleado para determinar la actividad de la PPO fue el de Loira et al. [90] con una ligera modificación. Consistió en mezclar 150 μ L de la muestra con 3 mL de una disolución basada en catecol 0.07 M y tampón fosfato sódico 0.05 M a pH 6. Se realizó una medida de absorbancia del medio de reacción por triplicado a tiempo inicial y tras 10 min de reacción a una longitud de onda de 420 nm. Los resultados fueron expresados como unidades de actividad enzimática (U) y como porcentaje de actividad residual (RA). Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que causa un incremento de absorbancia de 0.001 unidades por minuto a 420 nm. Las U se definieron como la relación que se muestra en la ecuación (8), donde A_{10} es la absorbancia tras los 10 min de reacción, A_0 es la absorbancia inicial y t el tiempo de reacción. La RA se definió como la expresión (9), donde U_{Trat} son las unidades de actividad enzimática obtenidas en los mostos tratados tras 10 min y U_{ST} son las unidades de actividad enzimática obtenidas en el mosto sin tratar tras 10 min.

$$U = \frac{A_{10} - A_0}{t \cdot 0.001} \quad (8)$$

$$RA (\%) = \frac{U_{\text{Trat}}}{U_{\text{ST}}} \cdot 100 \quad (9)$$

5.5. Inactivación microbiológica

Se realizó un análisis microbiológico en los mostos tratados y sin tratar para comprobar la efectividad del tratamiento con scCO_2 . Para ello, se distinguió entre microorganismos aerobios totales, levaduras y bacterias lácticas. Para el recuento de los microorganismos aerobios totales, se empleó el medio PCA (Plate Count Agar) compuesto por triptona (4.5 g/L), extracto de levadura (2.25 g/L), glucosa (0.90 g/L) y agar (13.5 g/L). Para el recuento de las colonias de levaduras, se preparó medio YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) compuesto por extracto de levadura (1%), peptona bacteriológica (2%), glucosa (2%), agar (2%) y el antibiótico cloranfenicol (100 mg/L). Para el recuento de las bacterias lácticas, se empleó el medio MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) compuesto por hidrolizado de caseína (10 g/L), extracto de carne (10 g/L), extracto de levadura (10 g/L), glucosa (20 g/L), hidrogeno fosfato de dipotasio (2 g/L),

Materiales y métodos

acetato de sodio (5 g/L) citrato de diamonio (2 g/L), sulfato de magnesio (0.20 g/L), sulfato de manganeso (0.05 g/L) y Tween 80 (1.08 g/L).

Una vez preparados todos los medios de cultivo, en condiciones de esterilidad se sembraron 100 μ L de los diferentes mostos sin diluir, en cada tipo de placa por triplicado. Una vez realizada la siembra en césped, se incubaron a 30 °C durante 48 h. Las unidades formadoras de colonias por mililitro de siembra (UFC/mL) se calcularon una vez transcurrido el tiempo de incubación. Para demostrar la eficacia del tratamiento con scCO_2 , se expresaron los resultados en función del valor D o tiempo de reducción decimal, es decir, el tiempo de tratamiento necesario para reducir la población inicial un 90 %. El valor D viene expresado por la siguiente expresión (10), donde N_0 son las UFC/mL del mosto sin tratar, N son las UFC/mL de los mostos tratados, D es el tiempo de reducción decimal y t el tiempo de tratamiento efectuado.

$$\log N_0 - \log N = \frac{1}{D} \cdot \Delta t \quad (10)$$

5.6. Análisis estadístico

Para analizar cualquier diferencia significativa entre los tratamientos, se realizó un ANOVA Simple según el análisis LSD (Least Squared Differences – Mínimas diferencias significativas) a un p-valor < 0.05. Para ello se hizo uso del software Statgraphics Centurion 18 (Statgraphics Technologies, The Plains, EE.UU).

6. Resultados y discusión

6.1. Caracterización fisicoquímica de los mostos

6.1.1. pH y acidez

El pH y la acidez son dos conceptos interrelacionados en el análisis de los alimentos: mientras que el pH es importante para evaluar la capacidad de un microorganismo para crecer en un alimento específico, la acidez es un mejor predictor de cómo los ácidos orgánicos del alimento afectan al sabor. El pH expresa las concentraciones de iones hidrógeno (H^+) mientras que la acidez trata la medición de la concentración total de ácido existente [91].

El tratamiento con scCO₂ puede hacer descender el pH cuando este se disuelve en la parte acuosa de un alimento líquido como el zumo, formando ácido carbónico (H₂CO₃), que además se disocia para dar iones bicarbonato (HCO₃⁻), carbonato (CO₃²⁻) e H⁺ [92]. Sin embargo, en este estudio las diferentes muestras de mosto tratadas con scCO₂ permanecieron invariables respecto a su comparación con las muestras sin tratar (**Tabla 2**). En ningún caso existió un cambio estadísticamente significativo a un $p < 0.05$. Estos datos siguen en concordancia con los expuestos en un trabajo realizado por Fabroni et al. [81], en el cual cuando trataron zumo de naranja a 130 bar y 36 °C, 28 % scCO₂, no encontraron diferencias significativas entre las muestras tratadas y las de control. Para el caso de un zumo de uva procesado a 140, 160 y 180 bar a 35 °C, 36.50 % scCO₂ durante 10 min, tampoco se detectaron cambios [80]. Briongos et al. [82] llevó a cabo otro estudio en zumo de naranja variando la presión de 100 a 300 bar, sobre un rango de temperaturas de 2 a 40 °C, y tiempos de 3 hasta 60 min, pero tampoco detectó cambios. Este último trabajo le atribuye la posibilidad de invarianza a que el bajo pH del zumo de naranja dificultara la disociación del ácido carbónico. El estudio que se ha realizado en este trabajo presentaba un pH cercano al de esos estudios, por lo que se puede pensar que es por esto último por lo que este parámetro no varía. Sin embargo, existen otros autores que observan otros resultados. Illera et al. [70], en unos experimentos llevados a cabo en zumo de manzana a presiones de 200 bar, 45 °C, 60 % scCO₂ y con agitación de 200 a 600 rpm, donde se midió el pH inmediatamente después del tratamiento con scCO₂, se encontró que el pH descendió con diferencias significativas. No obstante, después de 2 h tras la despresurización, éste volvía a un valor cercano al inicial. En otro estudio realizado sobre zumo de lichi tratado a 80 bar, 36 °C y 90 % scCO₂ durante 2 min, Guo et al. [93] destaca que el pH del zumo de esta fruta disminuyó ligeramente, pero sin una diferencia significativa, lo que coincide con los resultados observados en este experimento.

Respecto a la acidez, si se observa la **Tabla 2**, en este trabajo se puede decir que sí se produjo un cambio, pero solamente con diferencias significativas entre la muestra tratada al 10 % scCO₂ y las tratadas al 40 y 70 % scCO₂. No se detectó ninguna diferencia significativa entre el control y

Resultados y discusión

las muestras tratadas. No obstante, esto no concuerda con lo descrito por otros autores como Guo et al [93], donde se reportó un leve aumento de los ácidos málico y tartárico, que son los principales ácidos de la fruta lichi, tras tratar el zumo de esta fruta a 80 bar, 36 °C y 90% scCO₂ durante 2 min. Informaron que a pesar de que aumentó la acidez, que probablemente indujo una bajada en el pH, no fue estadísticamente significativo. En el estudio realizado en el zumo de naranja a 130 bar, 36 °C, 28 % scCO₂, tampoco se detectaron diferencias significativas entre las muestras tratadas y las de control [81]. Este es el mismo caso del zumo de uva procesado a 140, 160 y 180 bar a 35 °C, 36.50 % scCO₂ durante 10 min, donde no hubo cambios significativos en el pH ni en la acidez [80]. En el presente trabajo, a pesar de que a 10 % scCO₂ los resultados son significativamente diferentes al 40 y 70 % scCO₂, ninguno de estos tratamientos presenta diferencias significativas respecto del control sin tratar, lo que concuerda con lo reportado en bibliografía.

Tabla 2. Valores de pH, acidez, °Brix y densidad medidos tras el tratamiento con scCO₂. ^{ab} Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas según la prueba de LSD ($p < 0.05$).

Muestra	pH	Acidez (C ₄ H ₆ O ₆ g/L)	°Brix	Densidad (g/cm ³)
Sin tratar	3.96 ^a ± 0.03	6.11 ^{ab} ± 0.16	20.41 ^a ± 0.15	1082.74 ^a ± 0.65
10 % scCO ₂	3.95 ^a ± 0.05	6.37 ^b ± 0.08	20.35 ^a ± 0.36	1082.97 ^a ± 0.88
40 % scCO ₂	3.94 ^a ± 0.02	5.80 ^a ± 0.12	18.95 ^b ± 0.00	1076.30 ^b ± 0.01
70 % scCO ₂	3.96 ^a ± 0.07	5.97 ^a ± 0.08	18.92 ^b ± 0.25	1075.64 ^b ± 1.64

6.1.2. °Brix y densidad

Los °Brix son una medida que informa sobre la proporción de azúcar que contienen frutas, verduras y otros alimentos, siendo equivalente 1°Brix a 1 g de sacarosa en 100 g de solución. Esta cantidad de materia se puede relacionar proporcionalmente con la densidad que presenta el alimento: una mayor cantidad de azúcares equivale a una mayor densidad. Por tanto, puesto que los azúcares son un aspecto clave tanto en el sabor de los zumos como en la vinificación, es vital analizarlos tras el tratamiento con scCO₂. Existen algunos estudios que no reportan cambios en los °Brix de diferentes zumos tratados con la tecnología del scCO₂. Un ejemplo es el zumo de fresa tratado con 300 y 600 bar, 45 °C y 72 % scCO₂ durante 30 min, donde los °Brix permanecen invariables ante las altas presiones tomadas. Además, este mismo estudio analizó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) los principales azúcares, identificando la fructosa, glucosa y sacarosa como primarios. Se observó un aumento de la glucosa y la fructosa que se

Resultados y discusión

atribuye a la hidrólisis de la sacarosa por el ambiente ácido provocado al tratar con scCO₂. Esto indujo un aumento de los azúcares totales, pero los °Brix permanecieron constantes [71]. Otro ejemplo es el zumo de naranja variando la presión de 100 a 300 bar, sobre un rango de temperaturas de 2 a 40 °C y tiempos de 3 hasta 60 min, donde tampoco se detectaron cambios [82]. Sin embargo, en un estudio realizado por Guo et al. [93] en el zumo de la fruta lichi tratado a 80 bar, 36 °C y 90 % scCO₂ durante 2 min, se produce un incremento tanto de sacarosa como de glucosa y fructosa tras el tratamiento con scCO₂ [93]. Como punto totalmente opuesto a estas tendencias, en el presente trabajo se ha detectado un descenso en los °Brix a medida que se aumentaba el porcentaje de CO₂ (**Tabla 2**), con diferencias significativas entre la muestra sin tratar o el tratamiento al 10 % scCO₂ con las muestras tratadas tanto a 40 como a 70 % scCO₂. Este descenso también es observable en la densidad de las muestras. Dentro de nuestro conocimiento, no tenemos presente ningún otro autor que haya presentado un resultado similar. En experiencias previas dentro del mismo grupo de investigación se han reportado descensos similares en los °Brix, pero se desconoce la causa, por lo que este resultado inesperado se necesita estudiar en mayor profundidad con otros métodos que aporten mayor información.

6.1.3. Color

Para evaluar y expresar en un lenguaje estándar de forma objetiva el color de una muestra, se hace uso de los espacios de color, siendo uno de ellos el CIELAB o CIE L*a*b*. De esta forma, el color se expresa como números, donde L* indica la luminosidad y a* y b* son las coordenadas cromáticas rojo/verde o amarillo/azul respectivamente. Las diferencias de color perceptible pueden clasificarse analíticamente según los valores que adquiere ΔE^* (**3**) como no perceptible (0-0.5) ligeramente perceptible (0.5-1.5), perceptible (1.5-3.0), muy visible (3.0-6.0) y grandes diferencias (6.0-12.0) [94].

Tal y como se puede observar en la **Tabla 3**, el tratamiento con scCO₂ afecta en los diferentes parámetros colorimétricos. A medida que se incrementa el porcentaje de scCO₂, el mosto mantiene su tonalidad verdosa (a* constante) pero se vuelve más oscuro (L* disminuye), sin diferencias significativas en ambos parámetros. Sin embargo, se observan diferencias significativas en las tonalidades amarillas que levemente va perdiendo el mosto (b* disminuye) tratado tanto a 40 como a 70% scCO₂ respecto al 10 % scCO₂ y al sin tratar. Respecto a la IC, este permanece casi constante con los diferentes tratamientos, sin mostrar ninguna diferencia significativa respecto al sin tratar. Solamente se han detectado diferencias significativas entre el tratado al 40 y 70 % scCO₂. Lo mismo ocurre con la T, que no presenta una estadística significativa, aunque presente una disminución de unas 0.50 unidades máximas entre el mosto sin tratar y el tratado al 70% scCO₂. Probablemente, este cambio en la tonalidad esté relacionado con el mismo cambio observado en los tres parámetros colorimétricos. A través del parámetro ΔE^*

Resultados y discusión

(**Tabla 4**) se puede decir que no se percibe una gran diferencia visual entre las muestras tratadas y la sin tratar, pero sí que a medida que se aumenta el porcentaje de scCO₂, incrementa esta diferencia y se hace más notable. Entre la muestra sin tratar y la tratada al 10 % scCO₂ la diferencia no es perceptible, mientras que entre la sin tratar y las tratadas al 40 y 70 % scCO₂ sí es ligeramente perceptible. Estos ligeros cambios de color se pueden observar en la **Tabla 3**.

Este estudio que se ha realizado en zumo de uva presenta resultados similares a otros zumos tratados con scCO₂. En el caso de un zumo de manzana tratado con presiones de 200 bar, 45 °C y 60 % scCO₂ durante 60 min, la luminosidad presentó valores ligeramente inferiores y no se observó ninguna diferencia significativa en la componente de a*, pero sí en el valor de b*, volviéndose más amarillo. El ΔE* entre el control y el zumo fue de 0.51 [70], similar al que se obtiene en este estudio al 40% de CO₂. Para el zumo de naranja en el que se varió la presión de 100 a 300 bar, sobre un rango de temperaturas de 2 a 40 °C, y tiempos de 3 hasta 60 min, la luminosidad y el parámetro b* disminuyeron significativamente, indicando el oscurecimiento del zumo de naranja y un color más azulado después del tratamiento con scCO₂. Por el contrario, el aumento de la coordenada a* no fue significativamente diferente en el zumo de naranja no tratado y en el procesado [82]. Finalmente, en el zumo de fresa tratado con 300 y 600 bar, 45 °C y 72 % scCO₂ durante 30 min, tras el tratamiento los valores de L* y de la componente b* disminuyeron ligeramente, mientras que los de la componente a* aumentaron levemente. Sin embargo, los cambios en los valores L*, a* y b* no mostraron variabilidad con la presión. Además, se investigó el cambio de color durante el almacenamiento y se observó que no existía apenas diferencia entre los valores de ΔE* de las muestras a 300 y 600 bar [71].

Tabla 3. Parámetros colorimétricos L*, a*, b* del espacio de color CIELAB, intensidad colorante (IC), tonalidad (T) y color aproximado determinados después del tratamiento con scCO₂. ^{ab}Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas según la prueba de LSD (p < 0.05).

Muestra	L*	a*	b*	IC	T	Color aprox.
Sin tratar	96.60 ^a ± 0.14	-0.48 ^a ± 0.04	10.33 ^b ± 0.08	0.23 ^{ab} ± 0.01	3.44 ^a ± 0.02	
10 % scCO ₂	96.40 ^a ± 0.28	-0.57 ^a ± 0.03	10.03 ^{ab} ± 0.21	0.23 ^{ab} ± 0.01	3.30 ^a ± 0.21	
40 % scCO ₂	96.85 ^a ± 0.21	-0.49 ^a ± 0.18	9.84 ^a ± 0.05	0.21 ^a ± 0.00	3.33 ^a ± 0.27	
70 % scCO ₂	95.50 ^a ± 0.99	-0.47 ^a ± 0.15	9.82 ^a ± 0.17	0.26 ^b ± 0.03	2.92 ^a ± 0.47	

Tabla 4. Parámetro ΔE^* calculado para todas las relaciones posibles entre el mosto tratado y sin tratar en las distintas condiciones de estudio.

ΔE^*	Sin tratar	10 % scCO ₂	40 % scCO ₂	70 % scCO ₂
Sin tratar	-----	0.38 ± 0.16	0.57 ± 0.059	1.24 ± 0.79
10 % scCO ₂	0.38 ± 0.16	-----	0.52 ± 0.03	0.94 ± 0.68
40 % scCO ₂	0.57 ± 0.06	0.52 ± 0.03	-----	1.23 ± 0.95
70 % scCO ₂	1.24 ± 0.79	0.94 ± 0.68	1.23 ± 0.95	-----

6.2. Actividad enzimática

6.2.1. Índice de polifenoles totales y capacidad antioxidante

La uva es una de las frutas con mayor contenido fenólico. Además, es bien sabido que el contenido fenólico de los zumos de uva, o mosto, está estrechamente relacionado con sus cualidades sensoriales, en términos de color, sabor y astringencia, como con sus cualidades antioxidantes [95,96]. Por ello, el análisis sobre la posible variación de estos compuestos tras la aplicación del tratamiento con fluidos supercríticos es importante. Como se puede observar en la **Figura 5 A)** en este estudio, existe un aumento del IPT en las muestras tratadas respecto a la sin tratar, con una diferencia máxima de 0.35 unidades en el mosto tratado al 10% de scCO₂. Sin embargo, estos leves aumentos no son estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

En un estudio en zumo de manzana tratado a 100, 150, y 200 bar a 35 °C durante 10 min y un 67% de scCO₂ en volumen, todas las muestras mostraron el mismo IPT antes y después del procesado [83]. De manera bastante similar, Amaral et al. [80] tampoco detectaron cambios en un zumo de uva procesado a 140, 160 y 180 bar a 35 °C, 36.50 % scCO₂ durante 10 min. Sin embargo, el primer estudio resalta que existen otros autores que informan de un aumento del contenido de compuestos fenólicos en los zumos de frutas y verduras tras el procesado mediante tecnologías emergentes como las HPP, PEF y US. En estos estudios, el aumento está relacionado principalmente con una ruptura de la pared celular, lo que resulta en la liberación de estos compuestos al medio acuoso y, por tanto, su mayor cuantificación por las técnicas analíticas [97,98].

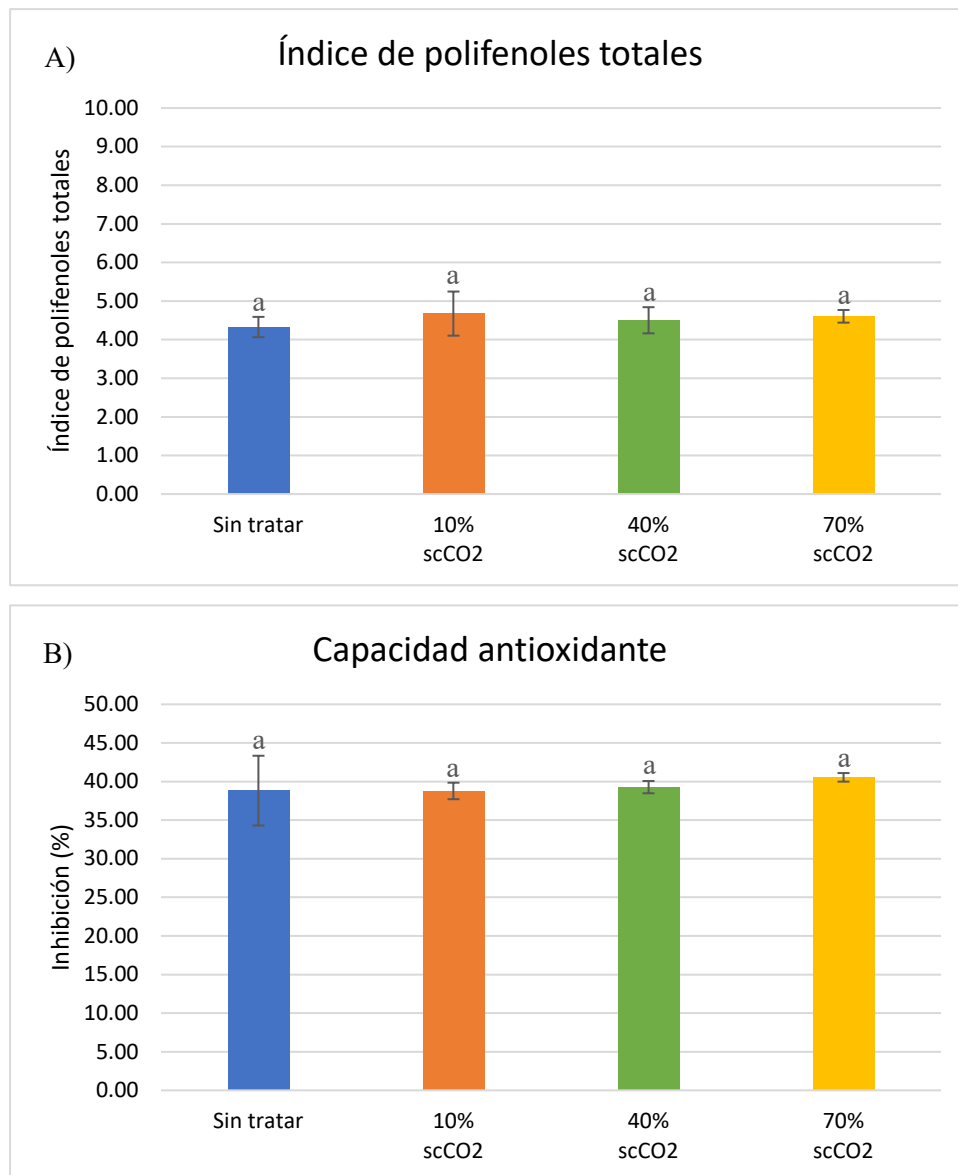


Figura 5. A) Valores del índice de polifenoles totales (IPT) y B) valores de grado de inhibición (% I) determinados tras el tratamiento con $scCO_2$. ^{ab}Letras diferentes en la misma figura denotan diferencias significativas según la prueba de LSD ($p < 0.05$).

Por otro lado, cada vez hay más pruebas de que, como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger los componentes celulares contra el daño oxidativo. Estas actividades antioxidantes de los compuestos fenólicos se atribuyen principalmente a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores y donantes de hidrógeno [99,100]. Por tanto, debido a que este estudio presenta un aumento del IPT, se puede relacionar directamente el aumento observado en el % I (**Figura 5 B**)), pero sin diferencias significativas. Esto significa que el tratamiento con $scCO_2$ no modifica la capacidad antioxidante. Illera et al. [70] en su tratamiento en zumo de manzana empleando de 100 a 200 bar, de 35 a 45 °C, 60 % $scCO_2$ y con agitación de 200 a 600 rpm, aunque no reportaron un cambio en el IPT, si detectaron un leve aumento en la capacidad

antioxidante tras el tratamiento, pero sin diferencias significativas. De manera similar ocurre en el tratamiento a 80 bar 36 °C y 80 % scCO₂ durante 2 min aplicado sobre al zumo de lichi, donde no hubo cambios en el IPT pero sí un leve aumento, no significativo, en la capacidad antioxidante [101]. De forma neutral ocurre con el estudio realizado por Silva et al. [83] en zumo de manzana tratado a 100, 150, y 200 bar a 35 °C durante 10 min y un 67% de scCO₂ en volumen, donde no se observó ninguna variación en el IPT ni en la capacidad antioxidante. Por ello, los resultados observados concuerdan con los expresados en la bibliografía.

6.2.2. Inactivación de la polifenoloxidasas

El pardeamiento es una de las principales razones del deterioro de la calidad de mostos y zumos de frutas. Este fenómeno se produce debido a las enzimas del grupo de las oxidorreductasas, como la PPO. Estructuralmente, el sitio activo de la PPO está formado por dos iones de cobre rodeados por una cisteína y seis residuos de histidina. Estos iones de cobre en el sitio activo juegan un papel importante en la estructura y la actividad de la PPO [102]. Los resultados obtenidos han presentado un descenso de la RA de la PPO, tal y como se representa en la **Tabla 5**. Todos los tratamientos mostraron diferencias significativas respecto al mosto sin tratamiento. Esta inactivación se pronuncia más en el mosto tratado al 40 % scCO₂ logrando que la RA disminuya hasta casi un 74 %, aunque sin diferencias significativas entre los tratamientos. Si se compara lo obtenido entre el tratamiento a 40 y 70 % de scCO₂, el empleo de un mayor porcentaje en volumen no parece afectar significativamente a la RA de la PPO de la uva empleada. En el presente estudio se investiga sobre el efecto según el porcentaje de CO₂ en volumen, mientras que otros, como el de Murtaza et al. [103], se analiza el grado de inhibición en cuatro fases: fase gaseosa (25 y 40 °C para 5 bar); fase líquida (25 °C para 100 bar); fase crítica (31.1 °C para 73.8 bar); fase supercrítica a 40 °C (100 y 250 bar) y 55 °C para 250 bar. En ese estudio, la RA alcanza un valor del 90% en la fase gaseosa y líquida, disminuyendo abruptamente hasta el 65% en el momento el que se alcanza la fase crítica. Concluyen que a medida que las condiciones de presión y temperatura aumentan, se obtiene aún menos RA. Otro ejemplo son los dos experimentos sobre zumo de manzana, ambos a 67% scCO₂, y tratado a 100 bar y 35, 40 o 45 °C / tratado a 45 °C a 100, 125, 150 o 200 bar durante un máximo de 120 min llevados a cabo por Illera et al [70]. En el primer caso se indica un claro descenso de la RA con el incremento de la temperatura, probablemente porque, además del propio efecto de la temperatura en la inactivación enzimática, al aumentar la temperatura, aunque la densidad del CO₂ disminuya, la difusividad del CO₂ puede mejorar y acelerar las colisiones moleculares entre las moléculas de CO₂ y la enzima. En el segundo caso, las presiones más elevadas indujeron tasas de inactivación más rápidas, pero independientemente del tratamiento, siempre se llegó a la misma RA, en torno al 6%, lo que justifica utilizar presiones más bajas de tratamiento, como las que se han empleado en este trabajo.

Resultados y discusión

Aunque aún no se haya establecido exactamente un mecanismo de inactivación enzimática, podría deberse a un aumento significativo de la difusibilidad del CO₂, perturbando así el centro catalítico y provocando cambios estructurales e inactivación de las enzimas [103].

Tabla 5. Unidades de actividad enzimática (U) y actividad residual (RA) de la polifenoloxidasas después del tratamiento con scCO₂. ^{ab}Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas según la prueba de LSD ($p < 0.05$).

Experimento	U	RA (%)
Sin tratar	6.41 ^a ± 0.17	-----
10 % scCO ₂	5.26 ^b ± 0.24	82.06 ± 3.75
40 % scCO ₂	4.74 ^b ± 0.12	73.87 ± 1.88
70 % scCO ₂	4.86 ^b ± 0.35	75.82 ± 5.52

6.3. Inactivación microbiológica

Varios estudios de la bibliografía han puesto de manifiesto una inactivación microbiana tras la aplicación del tratamiento con fluidos supercríticos. Sin embargo, los mecanismos de inactivación microbiológica del scCO₂ aún no están claramente establecidos, pero varios estudios, como el de Amaral et al. [104] en productos lácteos, recogen diversas explicaciones. Las más relevantes podría ser la extracción de componentes vitales y los cambios estructurales que ocurren en la membrana celular: la alta afinidad entre el CO₂ y la membrana plasmática hace que el CO₂ se acumule en la capa interna lipofílica, afectando su permeabilidad y extrayendo componentes vitales de las membranas celulares, como compuestos hidrofóbicos, alterando la estructura y/o el equilibrio de los nutrientes. En el presente estudio, a pesar de las altas desviaciones obtenidas, a medida que se aumenta el porcentaje en volumen de scCO₂, se denota una clara tendencia positiva en cuanto a la inactivación microbiológica si se observan las UFC/mL expuestas en la **Tabla 6**. Esta disminución se logra por igual tanto en medio PCA como en MRS e YPD, obteniendo una gran reducción en las muestras tratadas a 70 % scCO₂. Asimismo, aunque no se muestran diferencias significativas en el valor D, sí es cierto que se observa una disminución del valor D a medida que se aumenta el % de CO₂. Esta inactivación microbiológica destaca sobre todo para el 70 % scCO₂, donde los valores D son inferiores al tiempo de tratamiento. El medio PCA, al ser formulado para el crecimiento de microorganismos aerobios, presenta un mayor valor de UFC/mL que se divide en dos mitades aproximadamente parecidas, una mitad de levaduras para el medio YPD y otra mitad de bacterias lácticas para el medio MRS. Al parecer, las levaduras son más

Resultados y discusión

susceptibles que las bacterias lácticas al efecto estabilizante del scCO₂, ya que se observa una mayor disminución del 99 % en el medio YPD que la observada del 97 % en el medio MRS. Además, esto se observa mejor al tratar con 40 % scCO₂ ya que las levaduras se reducen cerca del 95 % mientras que las bacterias lácticas solo el 84 %, sin alcanzar el valor D. Por tanto, esta tecnología sería interesante en el tratamiento frente a algunas levaduras alterantes como *Brettanomyces*, que desarrollan olores y sabores anómalos en los vinos.

Los resultados observados en este estudio siguen las tendencias reportadas en la bibliografía. Spilimbergo et al. [79] realizaron un análisis bastante similar en zumo de melocotón y kiwi a 100 bar, 35 °C, 300 rpm de agitación y 65 % scCO₂, variando los tiempos de tratamiento en 1, 3, 5, 10 y 15 min. En sus resultados, las UFC/mL mostraron un paulatino descenso de 1 a 10 min, logrando entorno al 30 % de inactivación. Sin embargo, de los 10 a 15 min se indujo un gran descenso, alcanzándose finalmente un 90 % de inactivación. De forma similar ocurre en un zumo de manzana a 100 bar, 36 °C, 76 % scCO₂, 300 rpm agitación y 1, 5, 10 y 15 min de tratamiento. Se consigue una pasteurización no térmica casi total a los 5 min, lográndose finalmente a los 10 min de tratamiento [105]. Marszałek et al. [71] trataron zumo de fresa al 72 % scCO₂ y analizaron el crecimiento de tres formas: 45 °C, 30 min y 100, 300 y 600 bar; 600 bar, 30 min, 35, 45 y 65 °C; 100 bar, 45 °C, 10, 20 y 30 min. La mayor disminución del recuento microbiano total, prácticamente del 100 %, se observó con una presión de 600 bar, 30 min y 65 °C, siendo levemente inferior a 35 °C. Con el tratamiento a 300 bar y 45 °C, la disminución del recuento microbiano total fue menor, mientras que a 100 bares y 45 °C no se observó casi ningún efecto de inactivación, independientemente del tiempo de procesamiento. Por lo tanto, concluyeron que a la vista de los resultados de su estudio, el parámetro de mayor influencia era la presión empelada.

Tabla 6. Unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) y tiempo de reducción decimal (D) determinados en los tres medios empleados (MRS, PCA e YPD) tras el tratamiento con scCO₂. ^{abc}Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas según la prueba de LSD ($p < 0.05$).

Experimento	PCA		YPD		MRS	
	UFC/mL	D	UFC/mL	D	UFC/mL	D
Sin tratar	2195 ^a ± 276	-----	1070 ^a ± 42	-----	1160 ^a ± 85	-----
10 % scCO ₂	1280 ^b ± 339	46.74 ± 22.51	725 ^b ± 134	65.00 ± 30.45	835 ^b ± 120	76.07 ± 32.91
40 % scCO ₂	740 ^b ± 156	21.36 ± 4.12	55 ^c ± 21	7.73 ± 1.02	190 ^c ± 113	12.78 ± 4.26
70 % scCO ₂	65 ^c ± 35	6.48 ± 1.03	15 ^c ± 7	5.36 ± 0.61	30 ^c ± 14	6.25 ± 0.83

7. Conclusiones

El tratamiento con scCO₂ ha demostrado ser, en base a los resultados obtenidos, una buena alternativa para el tratamiento de estabilización enzimática y microbiológica de mostos de uva blanca, siendo los resultados obtenidos muy dependientes del porcentaje de CO₂ aplicado.

- Respecto a la modificación de los parámetros fisicoquímicos del mosto, no se han observado grandes diferencias entre el mosto sin tratar y el mosto al 10 % scCO₂ en todas las pruebas, aunque sí se han observado diferencias respecto a los tratamientos al 40 y 70 %, menos distintos entre sí. En el estudio sobre los parámetros fisicoquímicos como el pH y el color, tanto para 10, 40 y 70 % scCO₂, se identificó alguna pequeña o ninguna diferencia. No obstante, en otros como la acidez, los °Brix y la densidad se presentó un descenso a partir de 40 % scCO₂, que debe ser examinado con otros métodos analíticos.
- El tratamiento con CO₂ supercrítico no modifica ni el contenido en polifenoles ni la capacidad antioxidante de los mostos tratados respecto al control de manera significativa, lo que es un resultado altamente satisfactorio.
- El tratamiento con scCO₂ reduce la actividad residual de la PPO, observándose una gran reducción a todas las condiciones, y sin mostrar diferencias significativas entre las condiciones de tratamiento.
- Se ha confirmado que el tratamiento con scCO₂ se presenta como una alternativa viable y de gran potencial para la pasteurización no térmica de zumos, como es el zumo de uva o mosto, al lograr reducirse la población inicial más del 90 % con el tratamiento a 70 % scCO₂, alcanzándose incluso a 40% de scCO₂ en la eliminación de levaduras y bacterias lácticas.
- En base a los resultados obtenidos, las condiciones de 40% de CO₂ parecen las más convenientes a estas condiciones de presión y temperatura, ya que permite una buena estabilización del mosto modificando al mínimo las propiedades químicas del mosto.

8. Perspectivas futuras

El efecto antimicrobiano y antioxidante del scCO₂ abre la posibilidad de desarrollar zumos de uva y vinos sin la necesidad de añadir SO₂. Sin embargo, este efecto antimicrobiano puede resultar un problema si se desea realizar una vinificación mediante fermentación espontánea, al significativamente reducir la población inicial de levaduras endógenas, lo que dejaría únicamente lugar a llevar a cabo fermentaciones dirigidas. Por ello, el empleo de esta técnica debe optimizarse para lograr inhibir el desarrollo de las especies de deterioro no deseadas y no el de las levaduras y bacterias lácticas necesarias para la vinificación en blanco o en tinto. De igual forma, el análisis sensorial de este mosto o vino tratado con scCO₂ sería un aspecto interesante a analizar, puesto que es un producto alimentario que destaca principalmente por sus características organolépticas.

El análisis de la alteración de los parámetros colorimétricos como el que se ha realizado en este trabajo para el mosto de uva de vino blanco, debe realizarse de igual forma para variedades tintas, y evaluar el efecto que tiene sobre los antocianos.

Por último, para determinar la eficacia de esta tecnología a largo plazo sería necesario evaluar la evolución durante el almacenamiento de los zumos o vinos producidos a partir de mostos tratados con scCO₂, y establecer si este tratamiento podría plantearse como una alternativa al uso de algunos conservantes alimentarios.

9. Bibliografia

- [1] This, P., Lacombe, T., & Thomas, M. R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *TRENDS in Genetics*, 22(9), 511-519.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.07.008>
- [2] Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2005). Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 265-286.
<https://doi.org/10.1080/10408690490478118>
- [3] Cosme, F., Pinto, T., & Vilela, A. (2018). Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view. *Beverages*, 4(1), 22.
<https://doi.org/10.3390/beverages4010022>
- [4] Dutra, M. D. C. P., Viana, A. C., Pereira, G. E., Nassur, R. D. C. M. R., & dos Santos Lima, M. (2021). Whole, concentrated and reconstituted grape juice: Impact of processes on phenolic composition, “foxy” aromas, organic acids, sugars and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 343, 128399.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128399>
- [5] García-Martínez, D. J., Arroyo-Hernández, M., Posada-Ayala, M., & Santos, C. (2021). The high content of quercetin and catechin in airen grape juice supports its application in functional food production. *Foods*, 10(7), 1532.
<https://doi.org/10.3390/foods10071532>
- [6] Burin, V. M., Falcão, L. D., Gonzaga, L. V., Fett, R., Rosier, J. P., & Bordignon-Luiz, M. T. (2010). Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice. *Food Science and Technology*, 30, 1027-1032.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000400030>
- [7] dos Santos Lima, M., Silani, I. D. S. V., Toaldo, I. M., Corrêa, L. C., Biasoto, A. C. T., Pereira, G. E., ... & Ninow, J. L. (2014). Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food chemistry*, 161, 94-103.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.109>
- [8] Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., & Li, H. B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences*, 11(2), 622-646.
<https://doi.org/10.3390/ijms11020622>
- [9] Wu, B., Liu, J., Yang, W., Zhang, Q., Yang, Z., Liu, H., ... & Jiao, Z. (2021). Nutritional and flavor properties of grape juice as affected by fermentation with lactic acid bacteria. *International Journal of Food Properties*, 24(1), 906-922.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2021.1942041>

- [10] Lonvaud-Funel, A. (1995). Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects. *FEMS Microbiology Letters*, 126(3), 209-214.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07420.x>
- [11] Vázquez-Armenta, F. J., Bernal-Mercado, A. T., Pacheco-Ordaz, R., Gonzalez-Aguilar, G. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2018). Winery and grape juice extraction by-products. *Plant Food By-Products*, 157.
<http://dx.doi.org/10.1201/b22352-6>
- [12] Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J. L., Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1996). Effect of variety, year, and grape maturity on the kinetics of alcoholic fermentation. *American journal of Enology and Viticulture*, 47(4), 363-368.
- [13] Charoenchai, C., Fleet, G. H., & Henschke, P. A. (1998). Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(3), 283-288.ç
- [14] Calderón, F., Varela, F., Navascues, E., Colomo, B., González, M. C., & Suarez, J. A. (2001). Influence of pH and temperature in the biosynthesis of malic acid in wines by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bulletin de l'OIV*, 74(845-46), 474-486.
- [15] Mauricio, J. C., & Salmon, J. M. (1992). Apparent loss of sugar transport activity in *Saccharomyces cerevisiae* may mainly account for maximum ethanol production during alcoholic fermentation. *Biotechnology letters*, 14(7), 577-582.
<https://doi.org/10.1007/BF01023944>
- [16] Ansanay-Galeote, V., Blondin, B., Dequin, S., & Sablayrolles, J. M. (2001). Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 23(9), 677-681.
<https://doi.org/10.1023/A:1010396232420>
- [17] Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (2013). *Principles and practices of winemaking*. Springer Science & Business Media.
- [18] Du Toit, M., & Pretorius, I. S. (2000). Microbial spoilage and preservation of wine: Using weapons for nature's own arsenal.
<https://doi.org/10.21548/21-1-3559>
- [19] Drysdale, G. S., & Fleet, G. H. (1989). The growth and survival of acetic acid bacteria in wines at different concentrations of oxygen. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(2), 99-105.
- [20] Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., & Ribéreau-Gayon, P. (1983). Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(4), 874-880.
<https://doi.org/10.1128/aem.46.4.874-880.1983>

- [21] Sánchez-Ferrer, Á., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., & García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1247(1), 1-11.
[https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)00204-T](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)00204-T)
- [22] Vamos-Vigyazo, L. (1981). Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit Ver. Food Science Nutrition. Boca Raton/USA*, 49, 127.
- [23] Martínez, M. V., & Whitaker, J. R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*, 6(6), 195-200.
[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89054-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89054-8)
- [24] Bakker, J., Bridle, P., Bellworthy, S. J., Garcia-Viguera, C., Reader, H. P., & Watkins, S. J. (1998). Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(3), 297-307.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199811\)78:3%3C297::AID-JSFA117%3E3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199811)78:3%3C297::AID-JSFA117%3E3.0.CO;2-G)
- [25] Danilewicz, J. C. (2007). Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(1), 53-60.
- [26] McArdle, J. V., & Hoffmann, M. R. (1983). Kinetics and mechanism of the oxidation of aequated sulfur dioxide by hydrogen peroxide at low pH. *The Journal of Physical Chemistry*, 87(26), 5425-5429.
<http://dx.doi.org/10.1021/j150644a024>
- [27] Divol, B., du Toit, M., & Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(3), 601-613.
<https://doi.org/10.1007/S00253-012-4186-X>
- [28] Papazian, R. (1996). *Sulfites, safe for most, dangerous for some*. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration.
- [29] Vally, H., & Thompson, P. (2003). Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. *Addiction biology*, 8(1), 3-11.
<https://doi.org/10.1080/1355621031000069828>
- [30] Van Wyk, S., & Silva, F. V. (2019). Nonthermal preservation of wine. *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages*, 203-235.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816685-7.00007-0>
- [31] Kontaxakis, E., Trantas, E., & Ververidis, F. (2020). Resveratrol: A fair race towards replacing sulfites in wines. *Molecules*, 25(10), 2378.
<https://doi.org/10.3390/molecules25102378>

- [32] OIV - Límites máximos aceptables. (Accedido el 16 junio, 2022).
<https://www.oiv.int/es/normas-y-documentos-tecnicos/practicas-enologicas/limites-maximos-aceptables>
- [33] BOE.es - Reglamento Delegado (UE) 2019/934 de la Comisión, de 12 de marzo de 2019. (Accedido el 16 junio, 2022).
<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2019-80987>
- [34] BOE.es - Reglamento (UE) n o 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011. (Accedido el 16 junio, 2022).
<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2011-82311>
- [35] Vally, H., Misso, N. L., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(11), 1643-1651.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x>
- [36] Costanigro, M., Appleby, C., & Menke, S. D. (2014). The wine headache: Consumer perceptions of sulfites and willingness to pay for non-sulfited wines. *Food Quality and Preference*, 31, 81-89.
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.08.002>
- [37] Giacosa, S., Segade, S. R., Cagnasso, E., Caudana, A., Rolle, L., & Gerbi, V. (2019). SO₂ in wines: Rational use and possible alternatives. In *Red wine technology* (pp. 309-321). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00021-9>
- [38] Daudt, C. E., & Ough, C. S. (1980). Action of dimethyldicarbonate on various yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31(1), 21-23.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.07.003>
- [39] Divol, B., Strehaiano, P., & Lonvaud-Funel, A. (2005). Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. *Food Microbiology*, 22(2-3), 169-178.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.07.003>
- [40] Mckenzie, H. A., & White Jr, F. H. (1991). Lysozyme and α -lactalbumin: structure, function, and interrelationships. *Advances in protein chemistry*, 41, 173-315.
[https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60198-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60198-9)
- [41] Bartowsky, E. J., Costello, P. J., VILLA, A., & HENSCHKE, P. A. (2004). The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(2), 143-150.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2004.tb00017.x>
- [42] Bradshaw, M. P., Barril, C., Clark, A. C., Prenzler, P. D., & Scollary, G. R. (2011). Ascorbic acid: A review of its chemistry and reactivity in relation to a wine environment. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(6), 479-498.
<https://doi.org/10.1080/10408391003690559>

- [43] Vernhet, A. (2019). Red wine clarification and stabilization. In *Red wine technology* (pp. 237-251). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00016-5>
- [44] Nioi, C., Lisanti, M. T., Lacampagne, S., Noilet, P., Peuchot, M. M., & Ghidossi, R. (2020). Nanofiltration process as non-thermal alternative to thermovinification in Pinot noir winemaking. *OENO One*, *54*(1), 37-47.
<https://doi.org/10.20870/oeno-one.2020.54.1.2507>
- [45] Milani, E. A., Alkhafaji, S., & Silva, F. V. (2015). Pulsed electric field continuous pasteurization of different types of beers. *Food Control*, *50*, 223-229.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.033>
- [46] Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., & Álvarez, I. (2009). Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International journal of food microbiology*, *130*(1), 49-55.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.035>
- [47] Delsart, C., Grimi, N., Boussetta, N., Miot Sertier, C., Ghidossi, R., Vorobiev, E., & Mietton Peuchot, M. (2016). Impact of pulsed-electric field and high-voltage electrical discharges on red wine microbial stabilization and quality characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, *120*(1), 152-164.
<https://doi.org/10.1111/jam.12981>
- [48] Sulaiman, A., Farid, M., & Silva, F. V. (2017). Quality stability and sensory attributes of apple juice processed by thermosonication, pulsed electric field and thermal processing. *Food Science and Technology International*, *23*(3), 265-276.
<https://doi.org/10.1177%2F1082013216685484>
- [49] Puértolas, E., Saldaña, G., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chemistry*, *119*(3), 1063-1070.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.018>
- [50] Puértolas, E., Saldaña, G., Alvarez, I., & Raso, J. (2010). Effect of pulsed electric field processing of red grapes on wine chromatic and phenolic characteristics during aging in oak barrels. *Journal of agricultural and food chemistry*, *58*(4), 2351-2357.
<https://doi.org/10.1021/jf904035v>
- [51] Mok, C., Song, K. T., Park, Y. S., Lim, S., Ruan, R., & Chen, P. (2006). High hydrostatic pressure pasteurization of red wine. *Journal of Food Science*, *71*(8), M265-M269.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00145.x>
- [52] Evelyn, F. D. S. V. M. (2017). Inactivation of Pathogenic Microorganisms in Foods by High Pressure Processing. *Food Safety and Protection*, 341-377.
<https://doi.org/10.1201/9781315153414-10>

- [53] da Silva, F. V. M. (2017). High-pressure processing effect on microorganisms in fruit and vegetable products. In *High Pressure Processing of Fruit and Vegetable Products* (pp. 3-38). CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9781315121123-2>
- [54] Norton, T., & Sun, D. W. (2008). Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 2-34.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11947-007-0007-0>
- [55] Balda, F. P. (2017). Current status of industrial HPP equipment for food processing. *High Pressure Processing of Fruit and Vegetable Products*, 73-84.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.019>
- [56] Carballo, J., & Cofrades, S. (2017). Aplicación industrial de la alta presión en la industria cárnica. (Accedido el 16 junio, 2022).
<https://www.interempresas.net/Industria-Carnica/Articulos/185086-Aplicacion-industrial-de-la-alta-presion-en-la-industria-carnica.html>
- [57] Tao, Y., Sun, D. W., Górecki, A., Błaszczak, W., Lamparski, G., Amarowicz, R., ... & Jeliński, T. (2012). Effects of high hydrostatic pressure processing on the physicochemical and sensorial properties of a red wine. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 409-416.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.09.005>
- [58] Santos, M. C., Nunes, C., Rocha, M. A. M., Rodrigues, A., Rocha, S. M., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2013). Impact of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free white wine during bottle storage: Evidence for Maillard reaction acceleration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 51-58.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.001>
- [59] Kentish, S., & Feng, H. (2014). Applications of power ultrasound in food processing. *Annual review of food science and technology*, 5(1), 263-284.
<https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182537>
- [60] Sulaiman, A., Soo, M. J., Farid, M., & Silva, F. V. (2015). Thermosonication for polyphenoloxidase inactivation in fruits: Modeling the ultrasound and thermal kinetics in pear, apple and strawberry purees at different temperatures. *Journal of Food Engineering*, 165, 133-140.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.020>
- [61] Rokhina, E. V., Lens, P., & Virkutyte, J. (2009). Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in biotechnology*, 27(5), 298-306.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.001>

- [62] Silva, F. V. M., & Sulaiman, A. (2019). Polyphenoloxidase in fruit and vegetables: Inactivation by thermal and non-thermal processes.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21636-3>
- [63] Luo, H., Schmid, F., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2012). Viability of common wine spoilage organisms after exposure to high power ultrasonics. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(3), 415-420.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.06.009>
- [64] Milani, E., & Silva, F. V. (2017). Comparing high pressure thermal processing and thermosonication with thermal processing for the inactivation of bacteria, moulds, and yeasts spores in foods. *Journal of Food Engineering*, 214, 90-96.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.027>
- [65] Singleton, V. L., & Draper, D. E. (1963). Ultrasonic treatment with gas purging as a quick aging treatment for wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 14(1), 23-35.
- [66] Masuzawa, N., Ohdaira, E., & Ide, M. (2000). Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Japanese Journal of Applied Physics*, 39(5S), 2978.
<http://dx.doi.org/10.1143/JJAP.39.2978>
- [67] Martins, I. B. A., Oliveira, D., Rosenthal, A., Ares, G., & Deliza, R. (2019). Brazilian consumer's perception of food processing technologies: A case study with fruit juice. *Food Research International*, 125, 108555.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108555>
- [68] Reverchon, E. (2002). Micro and nano-particles produced by supercritical fluid assisted techniques: present status and perspectives. *Chem Eng Trans*, 2, 1-10.
- [69] Cansell, F., Aymonier, C., & Loppinet-Serani, A. (2003). Review on materials science and supercritical fluids. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7(4-5), 331-340.
<https://doi.org/10.1016/j.cossms.2004.01.003>
- [70] Illera, A. E., Sanz, M. T., Beltrán, S., Melgosa, R., Solaesa, A. G., & Ruiz, M. O. (2018). Evaluation of HPCD batch treatments on enzyme inactivation kinetics and selected quality characteristics of cloudy juice from Golden delicious apples. *Journal of Food Engineering*, 221, 141-150.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.10.017>
- [71] Marszałek, K., Skąpska, S., Woźniak, Ł., & Sokołowska, B. (2015). Application of supercritical carbon dioxide for the preservation of strawberry juice: Microbial and physicochemical quality, enzymatic activity and the degradation kinetics of anthocyanins during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 101-109.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.10.005>

- [72] Knez, Ž., Pantić, M., Cör, D., Novak, Z., & Hrnčič, M. K. (2019). Are supercritical fluids solvents for the future?. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 141, 107532.
<https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107532>
- [73] Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of food engineering*, 67(1-2), 21-33.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060>
- [74] Saldaña, M. D., dos Reis Coimbra, J. S., & Cardozo-Filho, L. (2015). Recovery, encapsulation and stabilization of bioactives from food residues using high pressure techniques. *Current Opinion in Food Science*, 5, 76-85.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.09.001>
- [75] Rosa, M. T. M., Alvarez, V. H., Albarelli, J. Q., Santos, D. T., Meireles, M. A. A., & Saldana, M. D. (2020). Supercritical anti-solvent process as an alternative technology for vitamin complex encapsulation using zein as wall material: Technical-economic evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 159, 104499.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.03.011>
- [76] Buratto, R. T., Hoyos, E. G., Cocero, M. J., & Martín, Á. (2019). Impregnation of açai residue extracts in silica-aerogel. *The Journal of Supercritical Fluids*, 146, 120-127.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.12.004>
- [77] Marszałek, K., Krzyżanowska, J., Woźniak, Ł., & Skąpska, S. (2017). Kinetic modelling of polyphenol oxidase, peroxidase, pectin esterase, polygalacturonase, degradation of the main pigments and polyphenols in beetroot juice during high pressure carbon dioxide treatment. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 412-417.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.018>
- [78] Smigic, N., Djekic, I., Tomic, N., Udovicki, B., & Rajkovic, A. (2019). The potential of foods treated with supercritical carbon dioxide (sc-CO₂) as novel foods. *British Food Journal*.
<http://dx.doi.org/10.1108/BFJ-03-2018-0168>
- [79] Spilimbergo, S., & Ciola, L. (2010). Supercritical CO₂ and N₂O pasteurisation of peach and kiwi juice. *International journal of food science & technology*, 45(8), 1619-1625.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02305.x>
- [80] Amaral, G. V., Silva, E. K., Cavalcanti, R. N., Martins, C. P., Andrade, L. G. Z., Moraes, J., ... & Cruz, A. G. (2018). Whey-grape juice drink processed by supercritical carbon dioxide technology: Physicochemical characteristics, bioactive compounds and volatile profile. *Food Chemistry*, 239, 697-703.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.003>

- [81] Fabroni, S., Amenta, M., Timpanaro, N., & Rapisarda, P. (2010). Supercritical carbon dioxide-treated blood orange juice as a new product in the fresh fruit juice market. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3), 477-484.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.02.004>
- [82] Briongos, H., Illera, A. E., Sanz, M. T., Melgosa, R., Beltrán, S., & Solaesa, A. G. (2016). Effect of high pressure carbon dioxide processing on pectin methylesterase activity and other orange juice properties. *LWT*, 74, 411-419.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.069>
- [83] Silva, E. K., Arruda, H. S., Eberlin, M. N., Pastore, G. M., & Meireles, M. A. A. (2019). Effects of supercritical carbon dioxide and thermal treatment on the inulin chemical stability and functional properties of prebiotic-enriched apple juice. *Food research international*, 125, 108561.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108561>
- [84] Illera, A. E., Sanz, M. T., Beltrán, S., Melgosa, R., Solaesa, A. G., & Ruiz, M. O. (2018). Evaluation of HPCD batch treatments on enzyme inactivation kinetics and selected quality characteristics of cloudy juice from Golden delicious apples. *Journal of Food Engineering*, 221, 141-150.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.10.017>
- [85] BOE.es - Reglamento (CEE) nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990. (Accedido el 16 junio, 2022).
<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1990-81412>
- [86] Espí Tomás, L. (2018). Influencia del raspón en la composición polifenólica de vino tinto de variedad monastrell. Universitat Politècnica de València.
- [87] Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
- [88] Bastante, C. C., Cardoso, L. C., Serrano, C. M., & de la Ossa, E. M. (2017). Supercritical impregnation of food packaging films to provide antioxidant properties. *The Journal of Supercritical Fluids*, 128, 200-207.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.034>
- [89] Benavent, J. L. A. (2003). *La cultura del vino: cata y degustación*. Universitat Politècnica de València, Serv. de publicaciones.
- [90] Loira, I., Morata, A., Bañuelos, M. A., Puig-Pujol, A., Guamis, B., González, C., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). Use of Ultra-High Pressure Homogenization processing in winemaking: Control of microbial populations in grape musts and effects in sensory quality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 50, 50-56.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.10.005>

- [91] Tyl, C., & Sadler, G. D. (2017). pH and titratable acidity. In *Food analysis* (pp. 389-406). Springer, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_22
- [92] Damar, S., & Balaban, M. O. (2006). Review of dense phase CO₂ technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. *Journal of food science*, 71(1), R1-R11.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb12397.x>
- [93] Guo, M., Wu, J., Xu, Y., Xiao, G., Zhang, M., & Chen, Y. (2011). Effects on microbial inactivation and quality attributes in frozen lychee juice treated by supercritical carbon dioxide. *European Food Research and Technology*, 232(5), 803-811.
<https://doi.org/10.1007/s00217-011-1447-3>
- [94] Yuk, H. G., Sampedro, F., Fan, X., & Geveke, D. J. (2014). Nonthermal processing of orange juice using a pilot-plant scale supercritical carbon dioxide system with a gas-liquid metal contactor. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(1), 630-638.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.12013>
- [95] Muñoz, S., Mestres, M., Busto, O., & Guasch, J. (2008). Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin extracts by HPLC-DAD: Validation study and response comparison of different standards. *Analytica Chimica Acta*, 628(1), 104-110.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.08.045>
- [96] Gurak, P. D., Cabral, L. M., Rocha-Leão, M. H. M., Matta, V. M., & Freitas, S. P. (2010). Quality evaluation of grape juice concentrated by reverse osmosis. *Journal of food engineering*, 96(3), 421-426.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.024>
- [97] Barba, F. J., Mariutti, L. R., Bragagnolo, N., Mercadante, A. Z., Barbosa-Canovas, G. V., & Orlie, V. (2017). Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 195-206.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.006>
- [98] Gomes, W. F., Tiwari, B. K., Rodriguez, Ó., de Brito, E. S., Fernandes, F. A. N., & Rodrigues, S. (2017). Effect of ultrasound followed by high pressure processing on prebiotic cranberry juice. *Food chemistry*, 218, 261-268.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.132>
- [99] Luqman, S., & Rizvi, S. I. (2006). Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in proteins by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(4), 303-306.
<https://doi.org/10.1002/ptr.1861>

- [100] Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2010). Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to in vitro oxidative insult. *Phytotherapy Research*, 24(S1), S11-S14.
<https://doi.org/10.1002/ptr.2853>
- [101] Liu, L., Zeng, Q., Zhang, R., Wei, Z., Deng, Y., Zhang, Y., ... & Zhang, M. (2015). Comparative study on phenolic profiles and antioxidant activity of litchi juice treated by high pressure carbon dioxide and thermal processing. *Food Science and Technology Research*, 21(1), 41-49.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>
- [102] Marszałek, K., Woźniak, Ł., Barba, F. J., Skąpska, S., Lorenzo, J. M., Zambon, A., & Spilimbergo, S. (2018). Enzymatic, physicochemical, nutritional and phytochemical profile changes of apple (Golden Delicious L.) juice under supercritical carbon dioxide and long-term cold storage. *Food chemistry*, 268, 279-286.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.109>
- [103] Murtaza, A., Iqbal, A., Linhu, Z., Liu, Y., Xu, X., Pan, S., & Hu, W. (2019). Effect of high-pressure carbon dioxide on the aggregation and conformational changes of polyphenol oxidase from apple (*Malus domestica*) juice. *Innovative food science & emerging technologies*, 54, 43-50.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.03.001>
- [104] Amaral, G. V., Silva, E. K., Cavalcanti, R. N., Cappato, L. P., Guimaraes, J. T., Alvarenga, V. O., ... & Cruz, A. G. (2017). Dairy processing using supercritical carbon dioxide technology: Theoretical fundamentals, quality and safety aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 94-101.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.004>
- [105] Gasperi, F., Aprea, E., Biasioli, F., Carlin, S., Endrizzi, I., Pirretti, G., & Spilimbergo, S. (2009). Effects of supercritical CO₂ and N₂O pasteurisation on the quality of fresh apple juice. *Food chemistry*, 115(1), 129-136.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.078>