



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

**CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA POR MÉTODOS
ESPECTROSCÓPICOS DE SEMILLAS DE *VITIS VINIFERA* COMO
COADYUVANTES DE LA VINIFICACIÓN**



MARÍA LUMBRERAS OLIVARES

Tutora: M^a Lourdes González-Miret Martín

Área de Nutrición y Bromatología

Cotutor: Francisco José Rodríguez Pulido



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

**CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA POR MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS DE SEMILLAS
DE VITIS VINIFERA COMO COADYUVANTES DE LA VINIFICACIÓN**

MARÍA LUMBRERAS OLIVARES

FACULTAD DE FARMACIA – DICIEMBRE 2019

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL

ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

TUTOR: M^ª LOURDES GONZÁLEZ-MIRET MARTÍN

COTUTOR: FRANCISCO JOSÉ RODRÍGUEZ PULIDO

TFG DE CARÁCTER EXPERIMENTAL

RESUMEN

Se han estudiado las semillas de uva blanca, fruto de la vid (*Vitis vinifera L.*), mediante técnicas espectrales y analíticas para obtener la cantidad de proteínas contenidas y ser aprovechadas como coadyuvantes de la vinificación. La técnica de análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo nos ha permitido separarlas por analogía de espectros en 5 grupos bajo la hipótesis de similar espectro-similar composición. El método analítico utilizado en esos 5 grupos de semillas ha sido el método Kjeldahl para obtener la cantidad de nitrógeno contenido en las mismas y, mediante un factor de conversión, se ha podido calcular la concentración de proteínas de las muestras. Los resultados de este estudio han demostrado que el método de análisis espectral es una buena técnica para diferenciar muestras realmente distintas sin necesidad de destruirlas. Los resultados de los análisis químicos demuestran que es un método eficaz para conocer el contenido de nitrógeno proteico de las semillas que se quieren utilizar como coadyuvantes durante la vinificación.

Este estudio forma parte de un proyecto en el que se han evaluado otros parámetros, no solo la concentración proteica contenida en las semillas de uva blanca de variedad Moscatel, para valorar el potencial que aportan las semillas como coadyuvantes en el proceso de la vinificación con el fin de mejorar la calidad de los vinos tintos de regiones de climas cálidos.

Las palabras claves principales atendiendo al título de este trabajo son: semilla de uva (grape seeds), método Kjeldahl (Kjeldahl method), imagen hiperespectral (hyperspectral imaging), vinificación (vinification, winemaking).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 LA VINIFICACIÓN Y EL VINO.....	9
1.2 LA UVA.....	10
1.2.1 LA SEMILLA DE LA UVA.....	11
1.3. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	12
1.3.1 IMAGEN HIPERESPECTRAL.....	12
1.3.2 VENTAJAS DE LAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE IMAGEN.....	13
1.4 SEMILLAS Y COPIGMENTACIÓN	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA	19
3.2 MUESTRAS.....	19
3.2.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	20
3.3 ANÁLISIS DE IMAGEN	21
3.3.1 IMÁGENES HIPERESPECTRALES	21
3.3.2. PROCESADO DE IMÁGENES	22
3.4 ANÁLISIS QUÍMICO	23
3.4.1. MATERIAL Y REACTIVOS	23
3.4.2 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL: MÉTODO KJELDAHL.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1 ANÁLISIS ESPECTRAL DE SEMILLAS	31
4.1.1 APLICACIÓN DE ESPECTROS E IMÁGENES HIPERESPECTRALES PARA LA DISCRIMINACIÓN DE SEMILLAS.....	33
4.2 ANÁLISIS QUÍMICO DE SEMILLAS	33
4.3 VALORES DE NITRÓGENO Y PROTEÍNAS EN SEMILLAS.....	35
5. CONCLUSIONES.....	36
6. REFERENCIAS	40

1. INTRODUCCIÓN

La evolución a nivel mundial del consumo del vino y de la ciencia que estudia el vino, la enología, ha hecho que se incremente la búsqueda de la calidad de los vinos. Considerando ésta como calidad sensorial, es una cualidad del vino subjetiva y se refiere a los diferentes factores percibidos durante la cata, factores caracterizados por una difícil cuantificación debido a que dependen de los gustos personales de los sumilleres, catadores o degustadores de vinos.

El objetivo principal de los productores de vino debe ser conseguir la mayor calidad posible del producto, por eso, la obtención de vinos de alta calidad debe empezar desde el inicio de la recolección de la uva y el transporte rápido hasta el lugar de producción (Canelo, 2014). Los enólogos son los asesores técnicos responsables de dirigir el proceso de elaboración. Son las personas que supervisan en la bodega todos los procesos que componen la vinificación: elaboración, almacenaje, análisis, conservación, embotellado y comercialización del vino. Son los encargados de decidir, entre otras cosas, el momento más adecuado para la recolección de la uva.

En general, el sector vitivinícola depende de factores muy variados para conseguir una producción de uva y vino rentable y de calidad (Nogales-Bueno, 2017).

Dicho esto, en este trabajo se estudia un subproducto de la vinificación, las semillas, como coadyuvantes en el proceso mencionado y, así, obtener vinos con mejores cualidades y con la mayor calidad posible.

1.1 LA VINIFICACIÓN Y EL VINO

La vinificación es el conjunto de procesos de elaboración por los cuales se transforma el mosto de la uva en una bebida alcohólica, el vino. El principal proceso de la vinificación es la fermentación alcohólica, que es un proceso biológico en ausencia de oxígeno que se da gracias a las levaduras, las cuales transforman los azúcares en etanol y CO₂.

Una correcta elección del momento de la vendimia y un amplio conocimiento del estado enológico de la uva son aspectos fundamentales en la calidad futura de un vino.

Para la vinificación en blanco tradicional, la pulpa es la principal fuente de componentes del mosto, sin intervención relevante de la piel ni las semillas de la uva, que se retiran tras el escurrido de la masa de vendimia, dejando solo el mosto para la fermentación. Sin embargo, para la producción de vino tinto, las pieles y las semillas permanecen junto al mosto durante la fermentación para la extracción de los pigmentos antociánicos y otros fenoles responsables de características sensoriales como color, astringencia y cuerpo (Bell y Henschke, 2005).

1.2 LA UVA

La uva es el fruto de la vid (*Vitis vinifera* L.) y es una baya globosa que se agrupa en racimos. Está formada por una película exterior que envuelve la uva y se llama hollejo, la pulpa es la parte carnosa que rellena la baya, el raspón es la rama pequeña que une el fruto con la vid y, por último, las semillas (Figura 1).

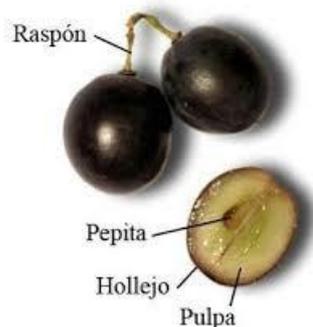


Figura 1. Partes de la uva

La madurez de las uvas en el momento de la cosecha es uno de los parámetros más importantes para obtener vinos tintos de alta calidad. Tradicionalmente, la decisión de la cosecha se debe tomar solo después de analizar la concentración de azúcar, la acidez valorable y el pH del jugo de uva (madurez tecnológica). Sin embargo, estos parámetros solo proporcionan información sobre la madurez de la pulpa y pasan por alto el grado real de maduración de las pieles y semillas (madurez fenólica), que son igualmente importantes para la vinificación. La madurez tecnológica se determina a través del contenido en sólidos solubles totales, o concentración de azúcares, el pH y la acidez total del mosto de la uva, mientras que la madurez fenólica está relacionada con los contenidos de compuestos fenólicos presentes mayoritariamente en las partes

sólidas del fruto, dicha madurez se logra cuando las semillas tienen baja concentración de taninos y el hollejo es rico en éstos y en antocianos. La madurez fenólica es importante porque es, grosso modo, la responsable de la astringencia y el color del vino.

No se alcanzan simultáneamente los vencimientos, tecnológico y fenólico, sino que tienden a separarse dependiendo de varios factores: variedad de uva, cultivar, condiciones climáticas adversas, suelo, disponibilidad de agua y prácticas culturales. Además, esta divergencia está aumentando como consecuencia del cambio climático (mayores cantidades de CO₂, menos lluvia y temperaturas más altas) (Meléndez et al., 2013).

1.2.1 LA SEMILLA DE LA UVA

Las semillas de uva constituyen una pequeña parte de la baya, pero afectan ampliamente las propiedades sensoriales del vino. Sus compuestos fenólicos son responsables de estas propiedades y cambian de manera cualitativa y cuantitativa durante la maduración. Los compuestos fenólicos más representativos de las semillas de uva son los flavanoles. Aunque las semillas representan solo el 0–6% del peso de las bayas, son una fuente importante de dichos compuestos para los vinos (Rodríguez-Pulido et al., 2014).

Durante el desarrollo de la semilla, su cubierta sufre muchas transformaciones estructurales y químicas, algunas de las cuales se manifiestan por cambios en el color. Existe una fuerte correlación entre el color de la cubierta de la semilla y la concentración de taninos extraíbles y ambos son secuencias naturales en el proceso de maduración de la semilla. Esto indica que los cambios en la composición fenólica de las semillas pueden reflejarse a través de los cambios en el color de su cubierta, por lo que el color puede ser un indicador o una guía de la madurez de la semilla. Una capa de semilla gruesa, dura y de color oscuro indica madurez e implica la impermeabilidad de la capa de semilla más externa. Los compuestos fenólicos en esta cubierta pueden actuar como una barrera bioquímica para la permeabilidad al oxígeno (Ristic y Iland, 2005).

Los principales componentes de las semillas de uva son: agua (25%-45%), hidratos de carbono (34%-36%), aceites (13%-20%), compuestos fenólicos (4%-6%), compuestos nitrogenados (4%-6,5%), minerales (2%-4%) y ácidos grasos (1%) (Ribereau-Gayon, 2006).

La semilla de uva representa aproximadamente el 0-6% del contenido total de las bayas y la cantidad de proteínas que contienen las semillas tiene un rango del 10 al 13% (Fantozzi, 1981).

1.3. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

La espectroscopía es una técnica óptica enfocada a la evaluación de las propiedades químicas de productos de la industria alimentaria. Sin embargo, su mayor restricción es que la medida se realiza sobre una superficie o volumen concreto y es necesaria cierta homogeneidad en la muestra para que el espacio de medida no sea una limitación (Rodríguez-Pulido, 2014).

La espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR) es una técnica no destructiva que permite cuantificar un elemento químico en una mezcla compleja de elementos sin trabajo previo de separación de la muestra y, por ello, ha sido utilizada con buenos resultados para desarrollar métodos que puedan reemplazar las técnicas tradicionales de análisis en uva (Ferrer-Gallego et al., 2011; Jarquín-Sánchez et al., 2011).

La característica común de estas técnicas es la interacción de la muestra con la radiación electromagnética como vehículo para el análisis. El análisis mediante este tipo de técnicas puede tener diversas variantes según el tipo de muestra y la radiación electromagnética empleada (Nogales-Bueno, 2017).

1.3.1 *IMAGEN HIPERESPECTRAL*

Las técnicas hiperespectrales surgen de la integración de la visión artificial convencional y de las técnicas espectroscópicas, determinando en un mismo análisis las propiedades espaciales y químicas de una muestra (Rodríguez-Pulido, 2014). La importancia de estas técnicas reside en que proporcionan la detección, cuantificación y evaluación de características que no podrían ser evaluadas utilizando el espectro visible, esto es la región del espectro electromagnético detectable por el ojo humano.

Una imagen hiperespectral tiene tantas bandas espectrales como se desee, en las que se recopila y procesa la información a través de todo el espectro electromagnético. Cada banda espectral pertenece a una longitud de onda diferente (Nogales-Bueno, 2017; Rodríguez-Pulido, 2014). En estas imágenes, cada banda, representada en escala de grises, corresponde a la reflectancia de la muestra a una única longitud de onda. La reflectancia espectral es la relación entre la energía reflejada y la energía incidente como función de la longitud de onda. Para la mayoría de materiales, la reflectancia espectral varía con la longitud de onda (Ruiz, 2016).

1.3.2 VENTAJAS DE LAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE IMAGEN

- No requiere preparación de la muestra.
- No requiere reactivos.
- Análisis simple, no invasivo y no destructivo.
- Económico y automatizable.
- Espectro de cada punto de la imagen.
- Elección de la región de interés.
- Medidas cualitativas y cuantitativas.
- Determinación de múltiples constituyentes.

A pesar de todas estas ventajas y de proporcionar gran cantidad de información, es un método de análisis indirecto, por lo que se necesita una calibración y una validación complicada; se puede producir superposición de bandas (Ruiz, 2016) y es difícil asignar dichas bandas a grupos funcionales. Además, requiere ordenadores que hagan frente a la cantidad de información que se tiene que procesar.

De hecho, un estudio sobre las imágenes hiperespectrales y multiespectrales para evaluar la inocuidad y calidad de los alimentos (Qin et al., 2013) pone de manifiesto que entre las desventajas de la técnica de análisis de imagen hiperespectral se encuentra la gran cantidad de datos que genera, lo que implica un gran coste computacional, y el elevado coste de los sistemas de análisis de imagen hiperespectral, características que ralentizan el avance en este campo. Es por esto, que una de las líneas de estudio más importantes en relación con el análisis de imagen hiperespectral es la identificación de longitudes de onda o pequeñas regiones de espectro

electromagnético que tengan gran importancia en las aplicaciones estudiadas. A partir de estas longitudes de onda de interés, pueden desarrollarse dispositivos de análisis de imagen multiespectral. Estos sistemas son menos complejos que los hiperespectrales y, por tanto, más económicos; recogen imágenes con menor resolución espacial y espectral, y permiten una adquisición y tratamiento de datos más rápidos, posibilitando así el uso de esta tecnología.

1.4 SEMILLAS, PROTEÍNAS Y COPIGMENTACIÓN

El fenómeno de copigmentación es un mecanismo asociado exclusivamente a la familia de los pigmentos antociánicos, que ocurre típicamente en medio acuoso y ampliamente extendido en la naturaleza. Como copigmentos, pueden actuar sustancias muy distintas: polisacáridos, compuestos fenólicos, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos e incluso los mismos antocianos asociados entre sí. Los requisitos que deben cumplir es poseer o adoptar una configuración estructural espacial plana, tener al menos un anillo aromático en su estructura para poder formar complejos que son los responsables del color (Gordillo, 2012) y estar en disolución con densidad electrónica diferente del otro copigmento.

La copigmentación es de vital importancia para comprender la relación entre la composición de la uva y el color del vino, la variación en el color y la concentración de pigmento entre los vinos, y todas las reacciones que involucran a las antocianinas durante el envejecimiento del vino (Boulton, 2001).

Desde la aparición del artículo "*The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review*", publicado en el año 2001 por Roger Boulton, los enólogos y la comunidad científica general volcaron su atención hacia este fenómeno que ocurría al parecer naturalmente en los vinos tintos jóvenes, que puede definirse como la suma de un antociano (pigmento) con un copigmento (molécula sin color), dando como resultado un complejo que muestra un mayor despliegue de color que el antociano solo en solución. Pero ¿cuánta importancia tiene en el vino tinto? Boulton declara que más del 50 % del color mostrado por un vino joven puede ser explicado por copigmentación.

Desde el punto de vista molecular, la copigmentación consiste en la formación de un complejo de estequiometría 1:1 (Figura 2), en el que un pigmento se apila con un copigmento, estableciéndose interacciones débiles entre las nubes electrónicas de los anillos aromáticos de ambos (Gordillo, 2012). Es una unión no covalente que origina un entorno hidrofóbico evitando que las moléculas de agua accedan al interior de esta estructura tipo sándwich produciendo así formas incoloras (García, 2017). El resultado de este fenómeno provoca la modificación de las propiedades espectrales del color del antociano aumentando la longitud de onda máxima de absorción y la absorptividad, cantidad de luz absorbida por el vino.

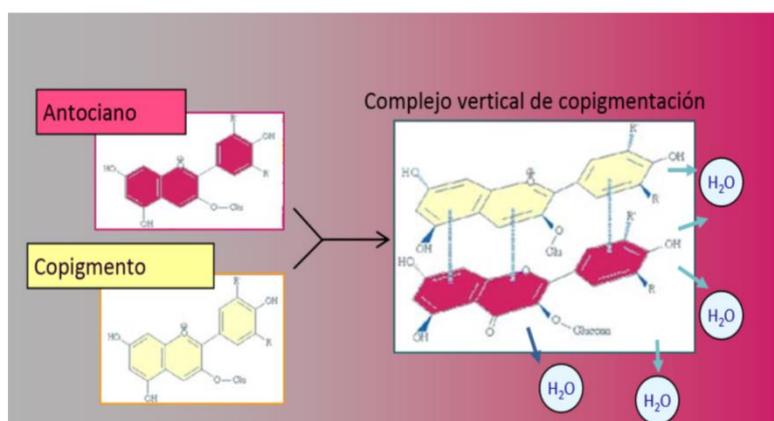


Figura 2. Proceso de copigmentación. Formación de complejos.

Los pigmentos responsables del color del vino son compuestos muy reactivos, inestables y sensibles a reacciones de degradación o de modificación de su color. El catión flavilio es la forma antocianica que participa en las reacciones de copigmentación. Los antocianos muestran un color rojo a pH ácido, en el cual predomina el catión flavilio. Entre pH 2 y 4, predomina la anhidrobase quinónica, de color azul. Entre pH 5 y 6, predominan la pseudobase carbinol y la chalcona, que son incoloras. A pH > 7, los antocianos son degradados dando un color amarillo o pardo (Gordillo, 2012; Rodríguez-Pulido, 2014).

A un pH típico de vino tinto de 3.5, aproximadamente el 6% de las antocianos libres cambian dando un color rojo. Entonces, cuando se agregan ciertos fenoles, que no son pigmentos, pueden formar un complejo con antocianos incoloros libres, lo que aumenta el color del vino (Darias-Martín et al., 2001).

En un estudio consultado sobre la influencia de la eliminación y adición de semillas en el color, composición fenólica y astringencia del vino tinto (Canals et al., 2008), se dictó que la eliminación de semillas disminuye considerablemente el color, la astringencia y el amargor de los vinos, mientras que la adición de semillas aumentó su cuerpo y astringencia. De esta manera, se concluyó que eliminar y agregar semillas afecta considerablemente al color, a la composición de los compuestos fenólicos y a la astringencia del vino.

Actualmente, el uso de proteínas procedentes de semillas de uva como copigmento en el proceso de vinificación se está estudiando, por esta razón, la búsqueda bibliográfica sobre este tema ha sido limitada. Pero tras la revisión bibliográfica (Gordillo, 2012; Rodríguez-Pulido, 2014) se entiende que solo aquellas proteínas que puedan adoptar una configuración estructural espacial plana y, además, poseer uno o varios anillos aromáticos en su estructura podrían tener la condición de copigmento.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es demostrar la heterogeneidad de la concentración de nitrógeno que contienen las semillas de uva blanca variedad Moscatel con el fin de ser utilizadas como subproducto para que ayude durante la vinificación. Se realiza mediante la caracterización espectral como método no destructivo de muestras de semillas de uva blanca.

Los objetivos específicos han sido:

- Revisión bibliográfica de los antecedentes y el estado actual de la materia.
- Utilizar métodos no destructivos y no perjudiciales para el medio ambiente como es la imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano, para la clasificación de semillas con espectros similares.
- Aplicar la metodología para el análisis de imagen de semillas de uva blanca mediante la obtención de imágenes para el estudio morfológico.
- Determinar el porcentaje de proteínas contenido en las semillas de uva blanca Moscatel mediante el método Kjeldahl.
- Correlacionar el % de proteínas de las semillas con la clasificación hiperespectral de las muestras.
- Evaluar la concentración de proteínas en semillas de uva blanca.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

El título de este trabajo de carácter experimental es “Caracterización tecnológica por métodos espectroscópicos de semillas de *Vitis vinifera* L. como coadyuvantes de la vinificación”. Se ha llevado a cabo el estudio de semillas de uva blanca (*Vitis Vinifera* L.) de variedad Moscatel mediante el análisis de la imagen hiperespectral realizado por un sistema compuesto por una fuente de iluminación, escáner, sistema óptico, espectógrafo, cámara y ordenador.

Para la recopilación de la bibliografía se consultaron las siguientes bases de datos: FAMA, Pubmed, Dialnet, ProQuest Ebook Central y ScienceDirect. Incluyendo artículos de revistas y libros consultados en la Biblioteca de la Universidad de Sevilla.

Se han realizado búsquedas bibliográficas específicas sobre las siguientes materias:

- Vinificación, el vino, la uva, las partes de la uva y, más concretamente, la semilla de la uva y su composición.
- Técnicas espectroscópicas, en especial, aquellas que se referían al análisis de imagen hiperespectral mediante infrarrojo cercano (NIR).
- Método de análisis químico Kjeldahl.

Una vez recopilada toda la información, tanto la obtenida de manera experimental como la obtenida a través de las bases de datos ya mencionadas, y distribuida según las partes del trabajo, se procedió a escribir el presente trabajo junto con las conclusiones basadas en la experimentación y en los datos obtenidos.

3.2 MUESTRAS

Para este trabajo se han utilizado 1.776 semillas de un solo muestreo de uva blanca (*Vitis vinifera* L.) de la variedad Moscatel de Alejandría, suministradas por la Bodega Málaga Virgen, S.A.U. (Fuente de Piedra, Málaga), de la campaña de 2015.

3.2.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

A su llegada, las muestras se conservaron envueltas en papel de aluminio y en frío. Se almacenaron en 19 placas de 96 pocillos, apilados y mantenidos en refrigeración a 4°C, de esta manera se identificó cada una individualmente.

Se midió el espectro infrarrojo de cada una de ellas con la cámara hiperespectral y se separaron en 5 grupos diferentes de acuerdo con su perfil espectral y con un algoritmo de k-medias (Figura 3), tras esta separación se conservaron las semillas de uva en tubos centrífuga de 50 mL (Figura 4).

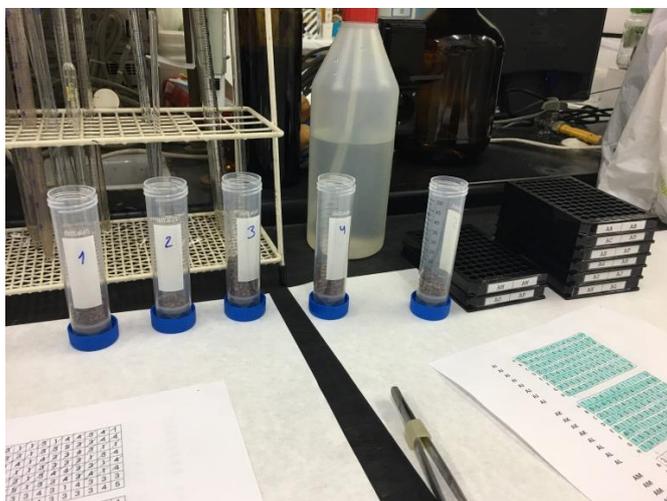


Figura 3. Identificación individual de las semillas.

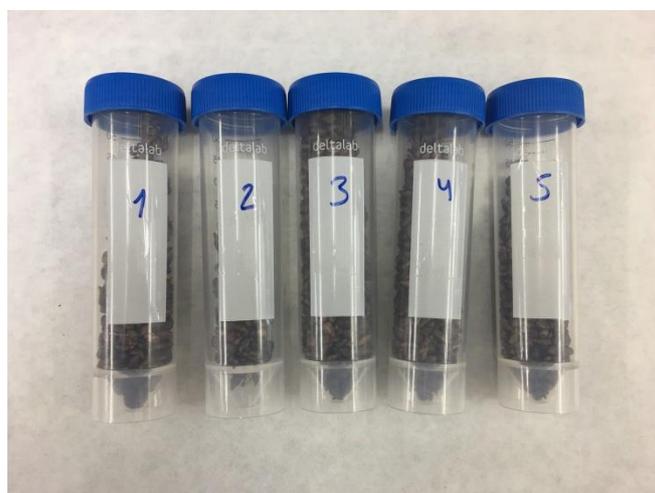


Figura 4. Conservación de semillas en tubos centrífuga.

Una vez divididas las semillas por grupos, se procedió a realizar la pesada de cada grupo, tras lo cual, se conservaron las muestras en refrigeración (4°C) hasta llevar a cabo su análisis químico por el método Kjeldahl.

3.3 ANÁLISIS DE IMAGEN

3.3.1 *IMÁGENES HIPERESPECTRALES*

Es una imagen que tiene varias bandas espectrales de información a través de todo el espectro electromagnético (Roman-Gonzalez y Vargas-Cuentas, 2013).

Para la obtención de imágenes en el espectro de infrarrojo cercano (NIR) de las semillas de uva blanca, se utilizó una cámara hiperespectral (Figura 5) que consta de las siguientes partes:

- **Cámara:** modelo Xeva 1.7-320, fabricada por Xenics® (Lovaina, Bélgica). Tiene un detector tipo InGaAs con refrigeración termoeléctrica y un intervalo espectral útil de 900 a 1700 nm, compuesto por una matriz de 320x256 píxeles. Posee una fuente de alimentación propia de 12 V y se comunica con el ordenador por USB 2.0.
- **Espectrógrafo:** modelo Inspector N17E de Specim® (Oulu, Finlandia). Dispersa la luz en longitudes de onda que van de 900 a 1700 nm, formando una imagen bidimensional de 14.2x7.6 mm (espacialxespectral). Por lo que la imagen queda registrada en su dimensión espacial en el eje de 320 píxeles de la cámara y la dimensión espectral de 7.6 mm queda registrada en el eje de la cámara de 256 píxeles. La resolución espectral del equipo es de 3.25 nm, resultado de repartir el intervalo útil del espectrógrafo en los 256 píxeles de la cámara.
- **Sistema de barrido:** modelo Mirror Scanner de Specim® (Oulu, Finlandia). Genera la dimensión espacial restante. Está diseñado para ser acoplado al espectrógrafo y es útil en el mismo intervalo del espectro electromagnético. Dispone de un espejo móvil que barre la superficie de muestra y permite construir el hipercubo (imagen con información espacial y espectral). Tiene una fuente de alimentación propia de 24 V y se comunica con el ordenador mediante un puerto USB 2.0.

- **Iluminación:** proporcionada por dos lámparas halógenas tipo cuarzo yodo de 70W Prilux® (Barberá del Vallés, Barcelona). Colocadas a la altura de la cámara, separadas 50 cm y dirigidas a 45° respecto a la superficie de la muestra.
- **Bandeja de muestra:** de polietileno con espectro concreto útil en los procesos de segmentación de las imágenes hiperespectrales.
- **Blanco de referencia:** es una pieza de cerámica certificada Spectralon® de 300×25×10 mm (Labsphere Inc., North Sutton, USA).
- **Software:** SpectralDAQ 3.62, Specim® (Oulu, Finlandia). El tiempo de integración de las imágenes es de 9 milisegundos y la tasa de muestreo de 50 Hz (imágenes por segundo), dependió de la iluminación y de la potencia del ordenador.

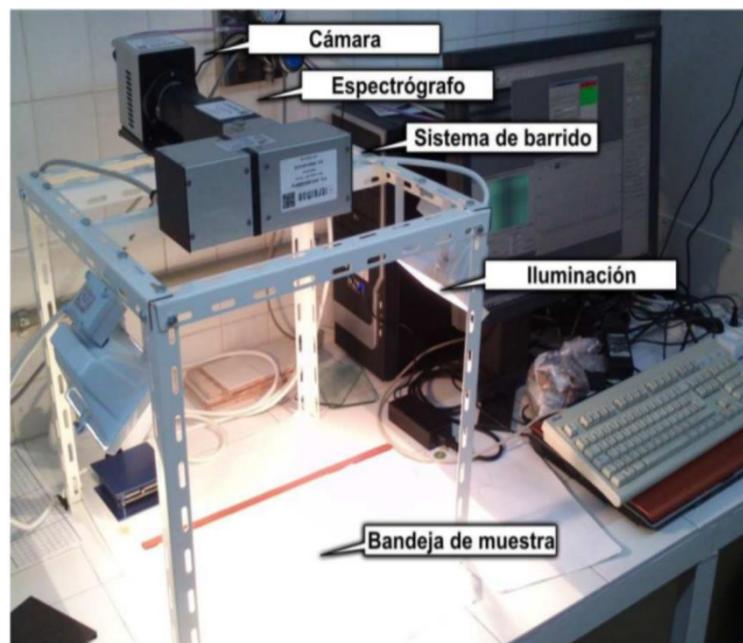


Figura 5. Equipo de análisis de imágenes hiperespectrales

3.3.2. PROCESADO DE IMÁGENES

Los datos obtenidos en el análisis de imágenes hiperespectrales se recogieron y se exportaron al programa MATLAB.

MATLAB es una plataforma para el cálculo científico y la programación de alto nivel que utiliza un entorno interactivo que permite realizar tareas de cálculo complejas de manera más eficiente que con los lenguajes tradicionales. Es una

herramienta de software de alto nivel para el desarrollo de algoritmos, visualización de datos, análisis de datos y análisis numérico. Es adecuado para resolver problemas que involucran cálculos técnicos utilizando algoritmos optimizados que se incorporan en comandos fáciles de usar (Pérez, 2014).

Este programa resulta muy útil para el análisis de imagen, ya que tanto las imágenes digitales como los hipercubos en imágenes espectrales son matrices tridimensionales (Ruiz, 2016).

3.4 ANÁLISIS QUÍMICO

3.4.1. MATERIAL Y REACTIVOS

- Balanza analítica
- Bloque digestor
- Sistema colector de humos
- Tubos digestores Kjeldahl de 150 mL
- Equipo de destilación por arrastre de vapor
- Erlenmeyer de 200 mL
- Bureta de divisiones de 0.1 mL
- Probetas de 50 mL
- Ácido bórico solución 4%
- Ácido Clorhídrico 0.1M
- Ácido Sulfúrico 96%
- Agua destilada
- Etanol 96% v/v
- Catalizador: Cobre II Sulfato 5-hidrato; Potasio Sulfato; Selenio metal polvo
- Indicador Mixto (Rojo de Metilo-Azul de Metileno)
- Piedra pómez en gránulos
- Hidróxido de sodio (lentejas)

3.4.2 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL: MÉTODO KJELDAHL

✓ FUNDAMENTOS

La determinación de las cantidades totales de nitrógeno es muy importante en la nutrición y bromatología, además del control de calidad de los productos farmacéuticos, especialmente las proteínas. El método Kjeldahl ha sido ampliamente utilizado desde 1883. Las muestras que contienen compuestos de nitrógeno se descomponen calentándolas con ácido sulfúrico concentrado. El sulfato de amonio resultante, diluido con agua, se calienta con hidróxido de sodio concentrado para liberar amoníaco, que se valora para proporcionar datos cuantitativos. El procedimiento de digestión se lleva a cabo a alta temperatura y genera gases tóxicos. Por lo tanto, todo el aparato debe colocarse en una cámara de aire que ocupa un espacio relativamente grande. Debido a estas exigencias del proceso, no es práctico analizar una gran cantidad de muestras (Yasuhara y Nokihara, 2001).

Hoy, este método es universalmente aceptado y utilizado en decenas de miles de laboratorios en todo el mundo para el análisis de nitrógeno en una amplia variedad de materiales, como alimentos, bebidas, productos agrícolas, muestras ambientales, productos químicos, bioquímicos y farmacéuticos. Sin embargo, un análisis exitoso requiere un muestreo y manejo de muestras adecuados, que dependen del tipo de material.

Se basa en una volumetría ácido-base. Es un procedimiento directo y fácilmente adaptable al análisis rutinario de un gran número de muestras. Es un método excelente para la determinación de proteínas contenidas en la semilla de la uva blanca de nuestro trabajo.

El método Kjeldahl ha sido validado y estandarizado para la estimación total de proteínas (crudas) para una amplia variedad de matrices alimentarias, indirectamente determinado por su contenido de nitrógeno, y es el método de referencia adoptado por muchas organizaciones internacionales. El procedimiento de Kjeldahl tiene varias variantes, basadas principalmente en el tamaño de la muestra y el aparato requerido. El control de calidad es esencial para mediciones precisas de nitrógeno por este método. A pesar de algunos

factores negativos (es peligroso, prolongado y laborioso), el método Kjeldahl y sus variantes con acabado instrumental siguen siendo métodos precisos y confiables (Sáez-Plaza et al., 2013).

La muestra es atacada por ácido sulfúrico 96%, y se transforma el nitrógeno orgánico en iones amonio, se emplea sulfato de cobre II y selenio como catalizadores. En un medio fuertemente básico, es posible la destilación del amonio, que es recogido sobre el ácido bórico. La posterior valoración con ácido clorhídrico permite el cálculo de la cantidad inicialmente presente en la muestra.

✓ PROCEDIMIENTO

A los 5 grupos de semillas se les analizó el nitrógeno total como medida estimativa de la concentración de proteínas.

Los procesos del método Kjeldahl son:

- I. **Digestión.** Para llevar a cabo este método, se pesó en una balanza analítica con una precisión de 0,1 mg, 1 g de la muestra, en este caso, se cogieron dos alícuotas de cada grupo de semillas. Se llevaron al tubo digestor Kjeldahl y se introdujeron sucesivamente unos granos de piedra pómez, 4,3 g de sulfato potásico (catalizador), 0.3 g de cobre II sulfato 5-hidrato (catalizador) y una punta de espátula de selenio metal polvo (catalizador), se produjo la mineralización de las muestras. Se agregaron 15 mL de ácido sulfúrico 96% en exceso y se mezcla suavemente por rotación.

Esta parte del proceso se realiza igual en dos tubos digestores Kjeldahl sin muestras, que se consideran los blancos del análisis.

En total, se utilizan 12 tubos digestores Kjeldahl (Figura 6).



Figura 6. Tubos utilizados en la digestión.

Se acopla el colector de humos y se pone en marcha el digestor (Figura 7) con la siguiente programación:

1. 15 min. a 125°C para evaporar el agua.
2. 15 min. a 300°C para reducir la producción de humos blancos (SO₂)
3. 90 min. a 400°C para completar la digestión.

Tras este tiempo, se deja enfriar hasta que los tubos alcancen la temperatura ambiente.

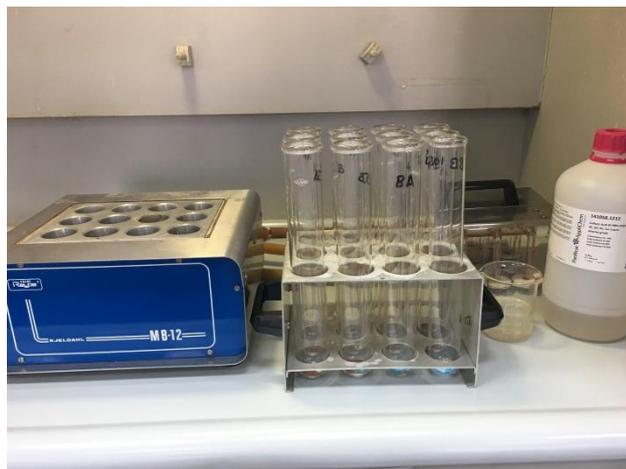


Figura 7. Digestor y tubos digestores preparados

- II. **Destilación.** Esta fase se realiza en un Erlenmeyer de 250 mL, se ponen 25 mL de ácido bórico solución 4% y unas gotas de indicador mixto. Se introduce hasta el fondo del Erlenmeyer la alargadera del aparato de

destilación. Se conecta el tubo digestor al destilador y se añaden 75 mL de hidróxido de sodio al 40% al tubo con la muestra accionando el pulsador durante 2 segundos, 3 veces consecutivas.

La destilación finaliza cuando se ha destilado mínimo 150 mL en el Erlenmeyer (Figura 8).

Lo que se obtiene en el Erlenmeyer es: ácido bórico, amoníaco, indicador y agua.



Figura 8. Proceso de destilación

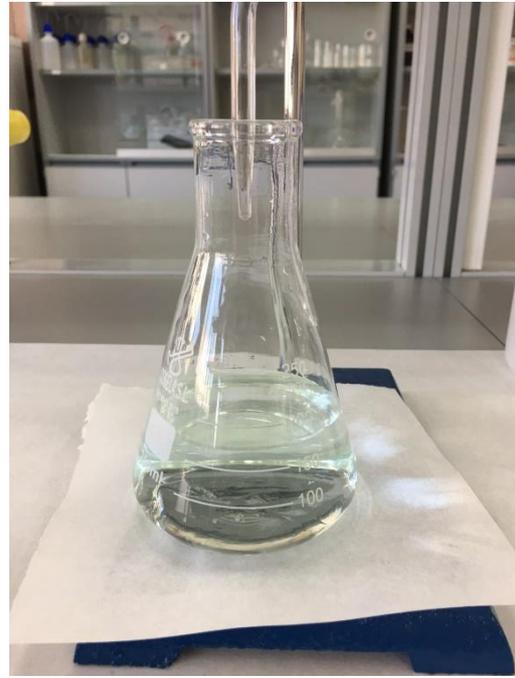
III. **Valoración.** Se realiza con ácido clorhídrico 0.1 M.

Primero, se hace una prueba en blanco. En el blanco se puede dar que necesite cierto volumen de ácido clorhídrico porque, seguramente, algo de sosa haya pasado al matraz del ácido bórico, de hecho, hay un leve cambio de color en la valoración del blanco. Para la realización de los cálculos de este trabajo, se realizó la media de las valoraciones de los dos tubos digestores considerados blancos, es decir, aquellos que no contenían muestras.

En el matraz obtenido de la destilación de los tubos con muestras, hay borato amónico, que se valora con ácido clorhídrico hasta cambiar el color del líquido (Figuras 9 y 10).

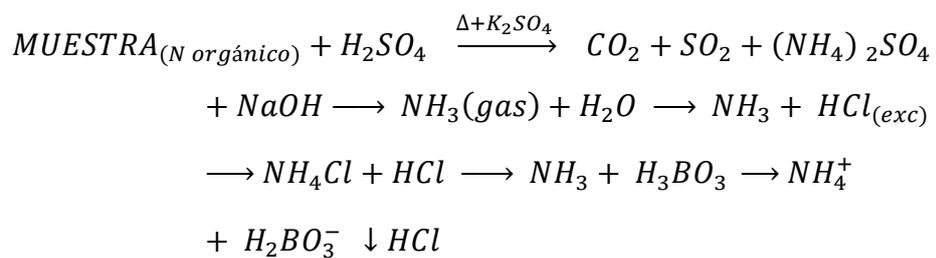
Aunque después de la digestión se tengan iones amonio, no se podrían valorar con hidróxido de sodio directamente, ya que hay exceso de ácido sulfúrico en el medio y, además, el ion amonio está unido a un

ácido muy fuerte necesitando una base muy concentrada, por eso hace falta hidróxido de sodio muy concentrado para desplazar los iones de amonio y destilarlos.



Figuras 9 y 10. Valoración del borato amónico con ácido clorhídrico

A continuación, se detalla el proceso químico que se lleva a cabo en este método:



✓ CÁLCULOS

Al conocer los mL de HCl empleados en dicha valoración, hallaremos la cantidad de nitrógeno en % p/p que contiene cada muestra estudiada gracias a la siguiente ecuación:

$$\%N_{\text{total}} = \frac{(V - V_1) \cdot N \cdot 0,014 \cdot F}{P} \cdot 100$$

$V = \text{mL HCl gastados en la valoración}$

$V_1 = \text{mL HCl gastados en la valoración del blanco}$

$N = \text{normalidad HCl}$

$F = \text{factor HCl}$

$0,014 = \text{peso de la masa equivalente del N (g)}$

$P = \text{peso en gramos de la muestra}$

El factor de conversión de nitrógeno a proteína es 5,53, es un dato específico para las semillas de uva, pero este factor varía según la matriz que se esté estudiando. Gracias a este dato se obtuvo de manera sencilla el % proteínas que contienen las semillas de uva blanca.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En un estudio sobre el uso de nitrógeno como nutriente en viñedo y en vinificación (Bell y Henschke, 2005) se encontró que la tecnología NIR podría facilitar en gran medida la utilización del nitrógeno como coadyuvante en la vinificación en el futuro cercano y ayudar a optimizar los componentes de calidad del vino. En este sentido, el presente trabajo aúna el uso de técnicas espectrales y la composición proteica de semillas de uva.

4.1 ANÁLISIS ESPECTRAL DE SEMILLAS

Se utilizaron muestras de uva blanca pertenecientes a la variedad Moscatel de Alejandría, recolectadas en la Denominación de Origen Málaga.

Tras la recepción de las muestras, se adquirieron imágenes digitales en el espectro de infrarrojo visible (NIR), siguiendo la metodología descrita por Rodríguez-Pulido (2014), quien concluye que la técnica de análisis de imagen desarrollada en el espectro de infrarrojo cercano, que es la utilizada en el presente trabajo, es una alternativa para la estimación de características químicas de las semillas debido a su simplicidad, versatilidad, rapidez y bajo coste.

En un estudio similar sobre el estado de madurez y la aptitud enológica en uva mediante análisis de imagen hiperespectral (Nogales-Bueno, 2017), se concluyó que en el intervalo espectral comprendido entre 950-1650nm la eficiencia del dispositivo de adquisición de imágenes hiperespectrales utilizado, el mismo que el empleado en nuestro trabajo, es adecuada.

Tras el análisis mediante la cámara espectral, método que se aplicó a cada semilla de manera individual, se dividieron las semillas en 5 grupos diferentes y se pesaron la totalidad de semillas de cada grupo obteniendo los siguientes datos (Tabla 1). Los resultados se expresan en gramos.

Dado que el peso medio de las semillas individuales es similar, en la Tabla 1 se observa que la muestra conservada en el tubo 3 es la de mayor peso indicando que sería la que mayor número de semillas contiene. En cambio, el tubo 2 es el de menor

peso presenta entendiéndose así que es este tubo que contiene una menor cantidad de semillas.

Tabla 1. *Peso de los grupos de semillas*

MUESTRAS	PESO (gramos)
Tubo 1	11,6777 g
Tubo 2	3,7020 g
Tubo 3	20,8682 g
Tubo 4	12,1839 g
Tubo 5	9,3963 g

Tras la obtención de los pesos totales de cada muestra, se seleccionaron, de forma aleatoria, dos alícuotas de aproximadamente 1 g de cada tubo de muestras, que se reservaron para la realización del posterior análisis químico. Mediante una balanza de precisión, se obtuvieron los correspondientes pesos (Tabla 2).

Tabla 2. *Pesos de las muestras tomadas para el análisis químico*

MUESTRAS	ALÍCUOTA A (gramos)	ALÍCUOTA B (gramos)
Tubo 1	1,0058 g	1,0057 g
Tubo 2	1,0018 g	1,0015 g
Tubo 3	1,0022 g	1,0001 g
Tubo 4	1,0009 g	1,0018 g
Tubo 5	1,0062 g	1,0042 g

4.1.1 APLICACIÓN DE ESPECTROS E IMÁGENES HIPERESPECTRALES PARA LA DISCRIMINACIÓN DE SEMILLAS

Para la optimización de la metodología, se pusieron las semillas en placas de pocillos, una a una, para que no hubiera interferencia ni sombras cuando se realizara el espectro, de esta manera se facilitó la segmentación, se aumentó la superficie de muestra en la imagen y se mejoró la representatividad.

Una de las ventajas de las técnicas de imagen es la obtención de información de cada punto de la muestra (Rodríguez-Pulido, 2014). En este caso, se consideró el espectro de cada muestra como la media de los espectros de reflectancia de todos los píxeles de la región de interés. Y se separaron en 5 grupos con un algoritmo de K-medias.

4.2 ANÁLISIS QUÍMICO DE SEMILLAS

Las alícuotas de las muestras se sometieron a análisis químico por el método Kjeldahl, para obtener el contenido de nitrógeno de las semillas. Las semillas sufrieron una digestión y, posteriormente, se realizó la destilación y la valoración, que son los pasos anteriormente explicados de los que se compone este análisis. En la Tabla 3, se pueden observar las cantidades de ácido clorhídrico (HCl) empleadas en cada valoración expresadas en mililitros. Primero, se valoraron los blancos (blanco A=0,3 mL de HCl; blanco B=0,5 mL de HCl), que son obtenidos de la digestión sin muestras.

Tabla 3. Cantidad de mL HCl gastados en la valoración del nitrógeno de cada muestra

MUESTRAS	mL de HCl de A	mL de HCl de B
1	9,3 mL	9,2 mL
2	9,1 mL	8,8 mL
3	9,0 mL	8,8 mL
4	8,8 mL	9,0 mL
5	8,6 mL	8,4 mL

Empleando semillas de tubos diferentes, se consideran muestras diferentes ya que, como vamos a ver, la discriminación de semillas mediante análisis espectral es acertada, además se extrajeron dos alícuotas de cada tubo para realizar el proceso dos veces y así obtener más datos y comparar mejor.

La diferencia de pesos es muy pequeña, alrededor del 0,01%, en cambio, la variabilidad del método de análisis está en torno al 5%. Dicho esto, la variabilidad en peso no justifica la variabilidad del análisis, por lo que hay un error sistemático y asumible.

La semejanza de los replicados es altísima, quiere decir que hay poca variabilidad en los replicados, esto es bueno porque de esta manera los resultados son fiables.

Un estudio sobre métodos de proteínas totales y su utilidad potencial para reducir el riesgo de adulteración de proteínas alimentarias (Moore et al., 2010), revisado para complementar este trabajo, expone que el método Kjeldahl ha sido validado y estandarizado para la estimación de proteínas totales (crudas) para una amplia variedad de matrices de alimentos y ha sido adoptado por AOAC International, AACC International, ISO y AOAC. También en un estudio sobre la evaluación de la digestión con persulfato alcalino como alternativa a la digestión de Kjeldahl para la determinación de nitrógeno y fósforo total y disuelto en agua (Patton, C.J. y Kryskalla, 2003) se dictó que el método Kjeldahl es el método de referencia para la determinación de nitrógeno. En principio, el nitrógeno orgánico, pero no el nitrato o nitrito, se reduce a amonio durante la digestión de Kjeldahl. Por lo tanto, la determinación de amonio según el método de Kjeldahl proporciona el contenido de nitrógeno orgánico y amoníaco. Ninguno de dichos estudios se realizó con muestras de semillas de uva blanca pero han demostrado que la eficacia de este método analítico es extrapolable a las semillas.

Por otro lado, muchos autores han informado de éxito en el uso de los espectros NIR junto con la quimiometría para asociar la información espectral con las propiedades de la muestra obtenidas por métodos convencionales (Sáez-Plaza et al., 2013).

Un estudio consultado sobre una revisión y algunos estudios sobre la proteína de la uva (Koch y Sajak, 1959) explicaba que la mayoría de las investigaciones sobre sustancias nitrogenadas se llevaron a cabo determinando el contenido total de nitrógeno por el Kjeldahl método. El contenido de proteína se estimó posteriormente utilizando un factor de conversión apropiado. Los valores de proteína obtenidos de esta manera no son representativos y se sobreestiman debido al hecho de que las uvas y los vinos contienen una cantidad considerable de sustancias nitrogenadas no proteicas.

4.3 VALORES DE NITRÓGENO Y PROTEÍNAS EN SEMILLAS

Utilizando los valores de las cantidades de HCl empleadas en cada alícuota de las muestras y la ecuación indicada en el apartado de cálculos del punto 3.4.2 *DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL*, hallamos el % N_{total} de las semillas. Junto con los resultados de la ecuación y el factor de conversión de nitrógeno a proteína 5,53; obtener el % de proteína de las semillas estudiadas es sencillo. Sin embargo, el método en sí no es sencillo, pero sí eficaz en muestras que presentan una determinada homogeneidad y así lo demuestran algunos de los artículos consultados para este trabajo (Beljkaš et al., 2010; Sáez-Plaza et al., 2013; Yasuhara y Nokihara, 2001).

Según se halla en la bibliografía (Wu y Lu, 2004), los aminoácidos que contienen las semillas de las uvas son Lisina, Metionina, Cisteína, Fenilalanina, Tirosina, Isoleucina, Leucina, Treonina, Valina, Histidina, Arginina, Glicina, Serina, Alanina, Ácido aspártico, Ácido glutámico y Prolina.

La cantidad de proteínas obtenidas supone alrededor de un 6,5% del peso total de la semilla. En un estudio realizado utilizando muestras de leche en polvo, sometiéndolas a NIR y al método Kjeldahl, los valores de proteínas obtenidos giran en torno al 8% (Inácio et al., 2011). Sin embargo, es complicado comparar resultados ya que son muestras completamente diferentes.

Según un estudio consultado sobre la semilla de la uva como fuente potencial de proteína, esta parte concreta de la uva contiene aproximadamente entre un 10% y un 13% de proteínas (Fantozzi, 1981) lo que contrasta con nuestros resultados de alrededor del 6,5% de proteínas contenidas en las semillas de uva. También, en otro

estudio similar sobre la diferenciación de las variedades de *Vitis vinifera* (L.) se obtuvo un nivel de proteína en las semillas estudiadas del 10% (Pesavento et al., 2008). En cambio, en el manual sobre enología de Ribereau-Gayon (2006), hemos comprobado que los compuestos nitrogenados de las semillas de las uvas están presentes en las mismas entre un 4% y un 6,5%, teniendo en cuenta que las proteínas contienen nitrógeno, podemos utilizar estos datos como referencia para comparar los % de proteínas obtenidos en nuestro trabajo.

Y se desconocen los niveles reales de proteína a los que un vino puede considerarse estable según expone un estudio sobre las proteínas del vino (Ferreira et al., 2001).

A continuación, se muestra en la Tabla 4 todos los datos obtenidos a lo largo de la fase experimental de esta investigación:

- Peso medio en gramos de las muestras obtenidas de la separación de semillas de uva por similitud de espectro NIR.
- % de Nitrógeno medio que contienen las semillas.
- % de Proteína medio que contienen las semillas.

Tabla 4. Datos de pesada, valoración y resultados de las semillas estudiadas

MUESTRA	PESO (g)	% Nitrógeno	%Proteína
1	1,0058	1,232	6,813
2	1,0017	1,195	6,608
3	1,0010	1,189	6,574
4	1,0014	1,189	6,572
5	1,0052	1,128	6,239

Mediante el método Kjeldahl, hemos obtenido los datos de nitrógeno que se muestran en la Tabla 4. Ya que, como se ha reflejado anteriormente citando bibliográficamente, es un método estandarizado y fiable para la obtención de valores de nitrógeno de muestras de origen alimentario, que es el caso. Por lo tanto, son datos de nitrógeno reales.

Observando la Tabla 4, hay una diferencia notable entre el % de proteínas de la muestra 1 y la muestra 5, teniendo pesos prácticamente iguales, por lo tanto, esto confirmaría que el análisis de imagen hiperespectral realizado inicialmente en el cual se dividieron las semillas en 5 grupos diferentes según espectros similares es fiable.

Dicho esto, se concluiría que el método Kjeldahl ha sido la prueba química que ha demostrado en este trabajo que la técnica espectral de imagen utilizada es válida. Esto es, que se confirma la hipótesis de similar espectro-similar composición.

5. CONCLUSIONES

Tras el desarrollo del estudio sobre las semillas de uva (*Vitis vinifera* L.) de la variedad Moscatel de Alejandría mediante técnicas espectrales y análisis químico, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La metodología de imágenes hiperespectrales resultó ser capaz de evaluar el contenido de nitrógeno de las semillas de uva blanca mediante un sencillo análisis en el cual se obtuvo un espectro en la región del infrarrojo cercano sin necesidad de tratamiento previo de la muestra.
- La espectroscopía en la región de infrarrojo cercano y el método Kjeldahl son técnicas compatibles y han demostrado su eficacia para la caracterización de semillas de uva blanca, por lo que se propone la medida espectral y el % de nitrógeno como parámetros para la clasificación de este tipo de muestras.
- La cantidad de proteínas contenidas en las semillas de una misma variedad de uva difiere de una semilla a otra, por lo que se necesitaría conocer primero el % de proteínas para poder utilizarlas como coadyuvantes de la vinificación y, así, tener control sobre los parámetros en los que éstas influyen en dicho proceso.

6. REFERENCIAS

Beljkaš B, Matić J, Milovanović I, Jovanov P, Mišan A, Šarić L. Rapid method for determination of protein content in cereals and oilseeds: validation, measurement uncertainty and comparison with the Kjeldahl method. *Accredit Qual Assur* 2010;15:555–61. doi:10.1007/s00769-010-0677-6.

Bell S, Henschke PA. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust J Grape Wine Res* 2005;11:242–95. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x.

Boulton R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am J Enol Vitic* 2001;52:67–87.

Canals R, Del Carmen Llaudy M, Canals JM, Zamora F. Influence of the elimination and addition of seeds on the colour, phenolic composition and astringency of red wine. *Eur Food Res Technol* 2008;226:1183–90. doi:10.1007/s00217-007-0650-8.

Canelo Prieto J. Planta de vinificación. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Sevilla. 2014; 149.

Darias-Martín J, Carrillo M, Díaz E, Boulton RB. Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chem* 2001;73:217–20. doi:10.1016/S0308-8146(00)00286-7.

Fantozzi P. Grape seed: A potential source of protein. *J Am Oil Chem Soc* 1981;58:1027–31. doi:10.1007/BF02679319.

Ferreira RB, Piçarra-Pereira MA, Monteiro S, Loureiro VB, Teixeira AR. The wine proteins. *Trends Food Sci Technol* 2001;12:230–9. doi:10.1016/S0924-2244(01)00080-2.

Ferrer-Gallego R, Hernandez-Hierro J, Rivas-Gonzalo J, Escribano-Bailon M. Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy. *Lwt-Food Sci Technol* 2011;44:847–53. doi:10.1016/j.lwt.2010.12.001.

García OP. “Contribución de las semillas y del raspón sobre la composición, color y

calidad del vino tinto; influencia del sistema de vinificación y del tratamiento del racimo.” La Rioja: Tesis; 2017.

Gordillo Arrobas B. Relación color-composición fenólica en vinos tintos de clima cálido. Evaluación de la copigmentación por Colorimetría Triestímulo. Sevilla: Tesis Universidad de Sevilla; 2012.

Inácio MRC, de Moura M de FV, de Lima KMG. Classification and determination of total protein in milk powder using near infrared reflectance spectrometry and the successive projections algorithm for variable selection. *Vib Spectrosc* 2011;57:342–5. doi:10.1016/j.vibspec.2011.07.002.

Jarquín-Sánchez A, Salgado-García S, Palma-López DJ, Camacho-Chiu W, Guerreto-Peña A. Análisis de nitrógeno total en suelos tropicales por espectroscopía de infrarojo cercano (NIRS) y quimiometría. *Agrociencia* 2011;45:653–62.

J. Koch, E. Sajak. A review and some studies on grape protein. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1959; 114–123.

Meléndez E, Ortiz MC, Sarabia LA, Íñiguez M, Puras P. Modelling phenolic and technological maturities of grapes by means of the multivariate relation between organoleptic and physicochemical properties. *Anal Chim Acta* 2013. doi:10.1016/j.aca.2012.11.021.

Moore JC, Devries JW, Lipp M, Griffiths JC, Abernethy DR. Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2010;9:330–57. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00114.x.

Nogales Bueno J. Estudio del estado de madurez y la aptitud enológica en uva mediante análisis de imagen hiperespectral. Sevilla: Tesis Universidad de Sevilla; 2017.

Patton, C.J. and Kryskalla J. Methods of analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory : evaluation of alkaline persulfate digestion as an alternative to Kjeldahl digestion for determination of total and dissolved nitrogen and phosphorus in water. 2003. doi:10.3133/wri034174.

Pérez López C. MATLAB Differential Equations. Berkeley, CA: Apress; 2014.

doi:10.1007/978-1-4842-0310-1.

Pesavento IC, Bertazzo A, Flamini R, Vedova AD, De Rosso M, Seraglia R, et al. Differentiation of *Vitis vinifera* varieties by MALDI-MS analysis of the grape seed proteins. *J Mass Spectrom* 2008;43:234–41. doi:10.1002/jms.1295.

Qin J, Chao K, Kim MS, Lu R, Burks TF. Hyperspectral and multispectral imaging for evaluating food safety and quality. *J Food Eng* 2013;118:157–71. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.04.001.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., Glories, Y., Maujean, A., y Branco, J. M. The Microbiology of Wine and Vinifications. En: *J. Wiley & Sons*, Editors. *Handbook of Enology*. 2ª Ed. Inglaterra: Wiley; 2006. 241-297.

Ristic R, Iland PG. Relationships between seed and berry development of *Vitis Vinifera* L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Aust J Grape Wine Res* 2005;11:43–58. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00278.x.

Rodríguez-Pulido FJ, Hernández-Hierro JM, Nogales-Bueno J, Gordillo B, González-Miret ML, Heredia FJ. A novel method for evaluating flavanols in grape seeds by near infrared hyperspectral imaging. *Talanta* 2014;122:145–50. doi:10.1016/j.talanta.2014.01.044.

Rodríguez-Pulido FJ. Aplicación de técnicas de imagen para la evaluación de la madurez fenólica de semillas de uva. Sevilla: Tesis Universidad de Sevilla. 2014.

Román-González A, Vargas-Cuentas NI. Análisis de imágenes hiperespectrales. *Revista Ingeniería & Desarrollo*, 2013;35:14-17.

Ruiz Alcalá C. Uso de técnicas de imagen en el visible e infrarrojo cercano para la evaluación de moras. Sevilla: Trabajo Fin de Máster Universidad de Sevilla; 2016.

Sáez-Plaza P, Navas MJ, Wybraniec S, Michałowski T, Asuero AG. An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part II. Sample Preparation, Working Scale, Instrumental Finish, and Quality Control. *Crit Rev Anal Chem* 2013;43:224–72. doi:10.1080/10408347.2012.751787.

Wu L-C, Lu Y-W. Electrophoretic Method for the Identification of a Haze-Active Protein in Grape Seeds. *J Agric Food Chem* 2004;52:3130–5. doi:10.1021/jf0352982.

Yasuhara T, Nokihara K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. *J Agric Food Chem* 2001;49:4581. doi:10.1021/jf010448z.