

IDENTIFICACIÓN DE ORIGEN Y CALIBRACIÓN PARA TRES COMPUESTOS QUÍMICOS EN CAFÉ, POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAROJO CERCANO

Andrés Mauricio Villegas Hincapié*; Carolina Pérez Henao**, Victoria Andrea Arana**, Tito Sandoval**;
Húver Elías Posada Suárez***; Ana Garrido Varo****; José Guerrero Ginel*****;
Dolores Pérez Marín****; Juan García Olmo*****

VILLEGAS H., A.M.; PÉREZ H., C.; ARANA, V.A.; SANDOVAL, T.A.; POSADA S., H.E.; GARRIDO V., A.; GUERRERO G., J.E.; PÉREZ M., D.; GARCÍA O., J. Identificación de origen y calibración para tres compuestos químicos en café, por espectroscopia de infrarrojo cercano. Revista Cenicafé 65 (1):7-16. 2014

La técnica de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) es una herramienta para la identificación de procedencia y la cuantificación de compuestos químicos en productos agrícolas; especialmente en café es una herramienta de autenticación, por ser de fácil utilización, precisa, reproducible, ajustable a las condiciones particulares de los productos y de bajo costo. De un ensayo en evaluación regional de progenies F5 del programa de Mejoramiento Genético de Cenicafé, ubicado en cinco localidades de la zona cafetera colombiana (Caldas, Quindío, Antioquia, Cauca y Cesar), se tomaron muestras de café (verde y tostado) para realizar la evaluación de la técnica NIRS, utilizando un equipo de mesa y un equipo portátil, con el fin de explorar su potencial en la identificación de procedencia y cuantificación de tres compuestos químicos en café verde y tostado. Se estableció la clasificación de cinco localidades basados en la distancia de Mahalanobis, con clasificaciones superiores al 83% en café verde y del 87% en café tostado; el error global de clasificación fue del 3% y 7% para las materias primas café verde y café tostado, respectivamente, usando el equipo portátil y el NIRS de mesa. Las ecuaciones de calibración presentaron mejor ajuste para los compuestos cafeína y trigonelina en café verde, y cafeína con ácidos clorogénicos en café tostado. Los resultados mostraron que la implementación de la técnica NIRS mediante el uso de equipos portátiles ofrece ventajas similares a los equipos de laboratorio en cuanto a robustez y exactitud, tanto para la identificación de orígenes como para la predicción de características químicas asociadas a la calidad.

Palabras clave: NIRS, café tostado, café verde, NIRS portátil, NIRS de mesa.

ORIGIN IDENTIFICATION AND CALIBRATION FOR THREE COFFEE CHEMICAL COMPOUNDS BY NEAR INFRARED SPECTROSCOPY

The technique Near Infrared Spectroscopy (NIRS) is a tool for identifying and quantifying source chemicals in agricultural products. Especially in coffee, it is considered an authentication tool due to its easy use, accuracy, reproducibility, adjustability to particular conditions of the products, and low cost. A regional assessment trial of F5 progenies from the Breeding Program of Cenicafé was done in five locations in the Colombian coffee region (Caldas, Quindio, Antioquia, Cauca and Cesar) by taking coffee samples (green and roasted) in order to evaluate the NIRS technique. An at-line and a handheld NIRS equipment were used to explore its potential in identifying origin and quantification of three chemical compounds in green and roasted coffee. The classification of five origins based on Mahalanobis distance, with ratings above 83% in green coffee and 87% in roasted coffee was established; overall classification error was 3% and 7% for green and roasted coffee, respectively, using the at-line and NIRS handheld. The calibration equations showed better fit for caffeine and trigonelline compounds in green coffee, and caffeine with chlorogenic acids in roasted coffee. The results showed that the implementation of the NIRS technique using at-line and handheld NIRS offers similar advantages to those of laboratory equipment in terms of robustness and accuracy, both for identifying origins and for the prediction of chemical characteristics associated with quality.

Keywords: NIRS, green coffee, roasted coffee, NIRS handheld, NIRS at-line.

*Asistente de Investigación, Disciplina de Calidad, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé.

** Investigadores Asociados (hasta el 30 de septiembre de 2012, 30 de junio de 2009 y 31 de enero de 2011, respectivamente), Disciplina de Mejoramiento Genético, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

*** Líder Nacional de Extensión. Gerencia Técnica, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia

**** Departamento de Producción Animal. Universidad de Córdoba - España.

***** Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba

En la identificación de procedencia en café se han utilizado diferentes métodos analíticos entre ellos isótopos estables (19, 21), cromatografía líquida de alta resolución-HPLC (2), espectroscopia acoplado al plasma (3), espectros de masas (13), espectroscopia Raman (20) y resonancia magnética nuclear (8), o la combinación de diferentes métodos analíticos (5); sin embargo, el uso de estas metodologías demanda recursos en tiempo, reactivos y mano de obra.

La técnica de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) se ha convertido en una herramienta para la cuantificación de compuestos químicos y clasificación de diversos productos agrícolas, entre los que se encuentra el café (9, 10). Además, ésta ha tomado importancia como herramienta de autenticación, en la medida que se ha convertido en una técnica de fácil utilización en la diferenciación entre las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (7, 11); de igual manera, ha tenido avances en la aplicación de identificación de procedencias con el desarrollo de modelos cualitativos y cuantitativos aplicados al café (12, 15, 16). Otra utilización de la técnica es la valoración de materias primas en forma rápida, segura, confiable y reproducible, en diferentes puntos de la cadena de comercialización, debido a que actualmente es una necesidad, tanto para asegurar la calidad del producto como la autenticidad (15).

Debido a las necesidades de análisis de productos agrícolas en diferentes estados de presentación y en diferentes puntos de la cadena de comercialización, se han desarrollado equipos portátiles que favorecen la captura espectral directamente en el campo o en el centro de acopio, diferente a los equipos convencionales que son utilizados en el laboratorio (1).

Estos equipos portátiles se caracterizan por ser robustos, precisos, reproducibles y ajustables a las condiciones particulares de los productos agrícolas y, de esta manera, la información espectral obtenida sirve para el posterior desarrollo de modelos de calibración de características físico-químicas que servirán para la evaluación del material en forma intacta en el campo y de forma más rápida (6, 18).

Los compuestos químicos cafeína, trigonelina y ácidos clorogénicos son compuestos que presentan rasgos de herencia cuantitativa (aditivos y heredables), los cuales ofrecen un potencial para realizar estudios de mejoramiento genético en la especie *Coffea arabica*. (16).

Bertrand *et al.* (4), usando la tecnología NIRS para comparar muestras de café procedentes de El Salvador, Costa Rica y Honduras, en un rango altitudinal de 700 a 1.600 m, establecieron el efecto de la altitud para los compuestos cafeína, trigonelina, ácidos clorogénicos, material grasa y sacarosa, encontrando diferencias significativas de los compuestos asociados a la altitud, y por lo tanto, se pudieron discriminar las muestras.

El objetivo de este estudio fue evaluar la técnica de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS), utilizando un equipo de mesa y un equipo portátil para explorar su potencial en la identificación de procedencia y cuantificación de compuestos químicos en café verde y tostado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Del Programa de Mejoramiento Genético de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia se analizaron 55 muestras de café verde molido y 55 muestras en tostado, provenientes de un ensayo en evaluación

regional, en cinco localidades de la zona cafetera colombiana (Tabla 1); las muestras de cada localidad fueron tomadas en la cosecha principal del año 2006.

Las muestras se obtuvieron de los genotipos que hacían parte de la evaluación regional en cada localidad, las cuales se cosecharon en el pase de cosecha de mayor volumen, tomando frutos totalmente maduros, beneficiados por vía húmeda y secados al sol hasta llegar a un porcentaje de humedad del 10% al 12%, obteniendo una masa de aproximadamente 1 kg por muestra.

Las muestras se trillaron y de éstas se seleccionaron almendras totalmente sanas, las cuales se congelaron a una temperatura de -80°C, durante 24 horas. Posteriormente, las muestras se molieron en un molino criogénico ultracentrífugo a 12.000 rpm, que permitió un tamaño de partícula menor a 1 mm de diámetro.

Así mismo, de la masa inicial de café verde se obtuvo el café tostado, procedimiento que fue realizado en un equipo PROBAT BRZ2, de capacidad para 250 g, con temperatura de tostión de 220°C, hasta obtener una tosti3n entre el 14% al 16% de p3rdida de peso; posteriormente, se realiz3a una molienda media, con tama3o de partícula entre 500 a 700 micras.

La captura de los espectros en café verde y tostado se realiz3a en un espectrof3tmetro

monocromador Foss NIRSystem 6500 (NIRSystems, Inc., Silver Spring, MD, USA) (Figura 1) utilizando cápsulas circulares de 3,5 cm de diámetro y con ventana de cuarzo. Los datos de reflectancia se guardaron como el logaritmo (1/R) (donde R= reflectancia) cada 2 nm, entre los 1.100 a 2.500 nm del espectro.

Se tomaron espectros con un equipo portátil POLYCHROMIX™ (Phazir 2400, Polychromix, Inc., Wilmington, MA) (Figura 2), con lectura directa sobre la materia prima a analizar. Cada espectro estuvo conformado desde las longitudes de onda de 1.600 a 2.400 nm de longitud de onda, donde cada punto de absorbancia se presentó como punto de datos (data point); de cada muestra se obtuvieron tres espectros en café verde y tres en café tostado.

Las lecturas NIRS se realizaron en las instalaciones de la Servicio Central de Apoyo a la Investigaci3n (SCAI) de la Universidad de Córdoba, Espa3a.

Los espectros se analizaron con el programa WINISI III (14), luego se cuantificaron los RMS (Root Means Square) entre espectros, se obtuvo el espectro promedio de cada muestra, en las dos materias primas analizadas.

Con la informaci3n espectral se realiz3a un análisis de Componentes Principales

Tabla 1. Ubicaci3n geogr3fica de los experimentos donde fueron tomadas las muestras de caf3.

C3digo	Departamento	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud
1301	Caldas	Naranjal	4° 58'	75° 39'	1.381 m
1302	Quindío	Paraguaicito	4° 24'	75° 44'	1.203 m
1303	Antioquia	El Rosario	5° 58'	75° 42'	1.635 m
1311	Cauca	El Tambo	2° 24'	76° 44'	1.735 m
1312	Cesar	Pueblo Bello	10° 25'	73° 34'	1.134 m



Figura 1. Equipo de mesa. Espectrofotómetro monocromador (Foss 6500).



Figura 2. Equipo portátil POLYCHROMIX™.

(ACP), posteriormente se realizó un análisis factorial discriminante (AFD) con las dos materias primas, para establecer la distancia de Mahalanobis entre localidades y los porcentajes de clasificación (22, 23).

Con los datos de referencia para los compuestos cafeína, trigonelina y ácidos clorogénicos, para cada tipo de café, se construyeron ecuaciones de calibración para los equipos FOSS 6500 (equipo de mesa) y el NIRS portátil, cumpliendo los requerimientos básicos para la selección de una adecuada ecuación de calibración (23, 24), de total de muestras se dejaron diez para la validación.

Las ecuaciones de calibración se desarrollaron usando cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS), se probaron

diferentes tratamientos matemáticos del espectro y se utilizó el correctivo de dispersión Variación Normal Estándar (SNV) y Detrend. Se seleccionaron las ecuaciones que presentaron los mejores parámetros estadísticos en calibración y validación interna (SEC, R, SEP R²).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 3 se presentan los espectros capturados en el equipo NIRS Foss 6500, para las dos materias primas, y en la Figura 4 los espectros capturados con el equipo portátil. Las diferencias se presentan especialmente asociadas al color en la zona del visible y a la absorbancia en la región NIRS, especialmente debido al proceso industrial al que es sometida la muestra en café tostado y molido.

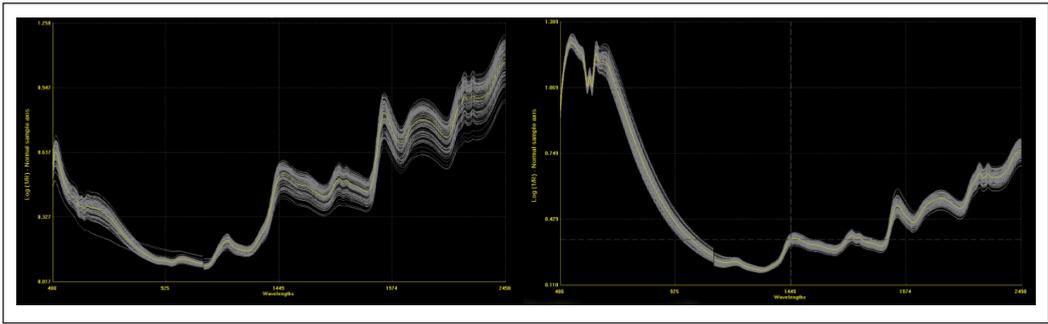


Figura 3. Espectros en café **a.** verde molido y **b.** tostado molido, obtenidos con un equipo de mesa.

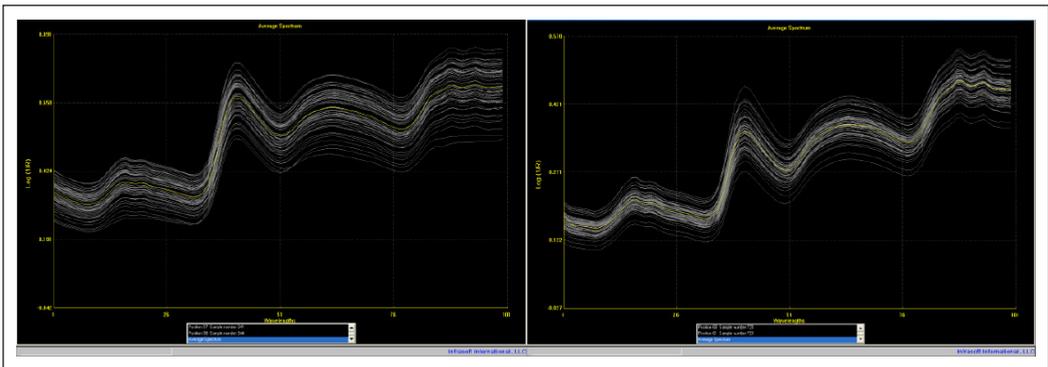


Figura 4. Espectros en café **a.** verde molido y **b.** tostado molido, obtenidos con un equipo NIRS portátil.

Los valores de RMS en café verde usando el equipo de mesa fueron del orden de 3.537 microabsorbancias (μabs) y de 2.375 para el café tostado, y con en el equipo portátil el promedio para café verde fue de 13.492 μabs y en café tostado de 3.313 μabs . El equipo de mesa presentó mejor repetibilidad espectral en café verde y tostado, mientras que el equipo portátil lo fue para café tostado, teniendo como valor de referencia de buena repetibilidad 10.000 μabs .

Los tres primeros PCA obtenidos en las dos materias primas analizadas usando el equipo Foss 6500 explicaron el 87,53% y 85,90%, y con el equipo portátil explicaron el 84,43% y 81,32% de la variación total para el café verde y tostado, respectivamente.

En la Tabla 2 se muestran las distancias de Mahalanobis para cada localidad, cada materia prima y cada equipo utilizado, los resultados mostraron diferencias altamente significativas entre localidades, lo que sugiere una diferenciación de las muestras debida a su información espectral. Las distancias fueron menores cuando se realiza el proceso de tostión en la mayoría de los casos en ambos equipos; es de resaltar que las localidades se encuentran ubicadas en zonas contrastantes de la geografía cafetera colombiana.

En el análisis discriminante para la materia prima café verde usando el equipo NIRS de mesa, se hallaron clasificaciones del 91% en la localidad del experimento 1311 (Cauca) y del 95% para el experimento 1312 (Cesar),

Tabla 2. Matriz de distancia de Mahalanobis (H) de muestras procedentes de cinco localidades de la zona cafetera colombiana.

Equipo	Materia prima	Localidad	Localidad			
			1302	1303	1311	1312
Equipo Foss	Verde	1301	31,9	56,8	70,6	36,5
		1302		51,4	34,0	38,4
		1303			40,4	36,0
		1311				39,7
	Tostado	1301	14,4	12,0	46,3	21,4
		1302		19,2	63,1	32,2
		1303			38,0	12,7
		1311				39,6
Equipo portátil	Verde	1301	20,4	31,8	82,1	22,2
		1302		29,3	41,2	25,0
		1303			87,8	13,6
		1311				90,1
	Tostado	1301	18,7	22,1	14,5	16,6
		1302		35,4	23,6	26,3
		1303			35,0	29,3
		1311				22,6

localidades que se encuentran ubicadas al sur y al norte del país; las demás localidades obtuvieron clasificaciones de 100% correctas. El error total de clasificación fue del orden del 3%, siendo las localidades de los experimentos 1311 y 1312 las que presentaron errores del 8% y 5%, respectivamente.

De igual forma, con este mismo equipo para la evaluación de la materia prima café tostado se hallaron clasificaciones del orden del 83% para el experimento 1301 (Caldas), del 90% para la localidad 1303 (Antioquia) y del 91,6% para el experimento 1312 (Cesar); las clasificaciones erróneas en la localidad de Caldas se asociaron a localidades que geográficamente se encuentran muy cercanas a ella, denominadas zona central cafetera (1302 y 1303).

Esta mezcla en las clasificaciones sugiere que la información espectral de estas muestras es similar, probablemente porque el proceso

de torrefacción disminuye las diferencias químicas, encontradas en café verde. De igual forma, las muestras procedentes de la localidad Cesar, experimento 1312, clasificaron espectros en las localidades de Quindío (1302) y Antioquia (1303). Los errores de clasificación para café tostado fueron del orden del 17% para la localidad 1301, 9% en 1303 y del 8% en 1312, hallándose un clasificación total errónea del 7%; errores de clasificación similares a los reportados por Myles *et al.* (18).

La evaluación del café verde con el equipo portátil presentó un porcentaje de clasificación mayor a 87,9% en la localidad 1312 (Cesar) y 97,17% en Antioquia, con errores de clasificación del 12% y 3%, respectivamente, y un error combinado para todas del 3%.

Las evaluaciones del equipo portátil en café tostado mostraron que el porcentaje de clasificación más alto fue para Antioquia

(1303 con 100% de clasificación) y el menor fue para Cesar (1312), con un 88,9%, además de un error combinado para todas las localidades del 5%.

Los errores de clasificación oscilaron entre el 8% y 17% para café verde y tostado con el equipo Foss 6500 y del 12% y 11% con el equipo portátil en las dos materias primas, respectivamente (Tabla 3).

Los resultados de clasificación son relevantes en la medida que permiten clasificar la procedencia de granos de café dentro de la zona cafetera colombiana. Lo anterior es similar a los datos obtenidos en Cenicafe para muestras con igual procedencia y durante los años de cosecha 2005 y 2006.

La estadística descriptiva obtenida de los datos analíticos utilizados en la calibración

Tabla 3. Clasificación discriminante en café verde y tostado procedente de cinco localidades de la zona cafetera colombiana y los errores de clasificación (%).

Aparato	Materia prima	Localidad	Localidad					Total
			1301	1302	1303	1311	1312	
Equipo Foss	Verde	1301	100					100
		1302		100				100
		1303			100			100
		1311		8,3		91,7		100
		1312			4,6		95,5	100
		Total	19,3	21,1	21,9	19,3	18,4	100
		Error				0,08	0,05	0,03
	Tostado	1301	83,3	4,17	12,5			100
		1302		100				100
		1303	9,1		90,9			100
		1311				100		100
		1312		4,2	4,2		91,7	100
		Total	18,0	18,9	22,1	21,3	19,7	100
		Error	0,17		0,09		0,08	0,07
Equipo portátil	Verde	1301	100					100
		1302		100				100
		1303			97,1		2,9	100
		1311				100		100
		1312		3,03	9,09		87,9	100
		Total	17,5	20,9	22,3	21,7	18,1	100
		Error			0,03		0,12	0,03
	Tostado	1301	91,7		2,8	2,8	2,8	100
		1302		96,7		3,3		100
		1303			100			100
		1311	2,6			97,4		100
		1312	11,1				88,9	100
		Total	21,79	16,2	20,11	23,46	18,44	100
		Error	0,08	0,03		0,03	0,11	0,05

se presenta en la Tabla 3, los valores se encuentran dentro de los rango reportados para la especie *Coffea arabica* L. (16).

Para cada equipo evaluado se desarrollaron ecuaciones de predicción con los datos de referencia obtenidos en Cenicafé para los compuestos químicos cafeína, trigonelina y ácidos clorogénicos en café verde y tostado.

Para el proceso de calibración, después de realizar diferentes tratamientos matemáticos a los espectros NIRS obtenidos en el equipo portátil, el mejor tratamiento matemático fue 1, 5, 5, 1 (derivada, segmento de onda, suavizado 1, suavizado 2); sin embargo, las ecuaciones para los compuestos ácidos clorogénicos en

café verde y trigonelina en café tostado no presentaron un buen ajuste, debido a los coeficientes de determinación inferiores al 50% usando el equipo portátil (Tabla 5).

Respecto a los tratamientos matemáticos para el grupo de calibración para el equipo NIRS Foss 6500, para materia prima café verde, el compuesto ácidos clorogénicos fue el único que no superó el coeficiente de determinación del 50%.

Los parámetros obtenidos para café verde presentan similitud a los reportados por Davireux *et al.* (9) y Shenk y Westerhaus (23). En café tostado no se cuenta con referencias hasta el momento.

Tabla 4. Valores promedio de referencia para los compuestos químicos analizados en dos materias primas de café.

Materia prima	Compuesto	Muestras	Promedio	Rango	Desviación estándar
Café verde	Cafeína	46	1,25	1,03 – 1,52	0,106
	Trigonelina	48	0,91	0,68 – 1,12	0,094
	Ácidos clorogénicos	41	5,23	4,61 – 5,89	0,324
Café tostado	Cafeína	47	1,2	0,98 – 1,41	0,098
	Trigonelina	41	0,6	0,49 – 0,73	0,057
	Ácidos clorogénicos	53	1,6	1,06 – 2,33	0,256

Tabla 5. Parámetros estadísticos obtenidos en la calibración para los compuestos químicos de dos materias primas de café para el equipo portátil.

Equipo	Materia prima	Compuesto	SEC	R2	1-VR	SEV	SEV(C)
Portátil	Verde	Cafeína	0,26	0,93	0,80	0,046	0,046
		Trigonelina	0,043	0,79	0,70	0,069	0,074
		A. clorogénicos	0,291	0,19	0,15	1,56	0,787
	Tostado	Cafeína	0,042	0,81	0,58	0,139	0,146
		Trigonelina	0,045	0,38	0,14	0,068	0,055
		A. clorogénico	0,058	0,94	0,91	0,011	0,061
Equipo Foss	Verde	Cafeína	0,035	0,88	0,78	-0,005	0,058
		Trigonelina	0,028	0,89	0,74	0,024	0,025
		A. clorogénico	0,190	0,48	0,17	0,506	0,522
	Tostado	Cafeína	0,011	0,98	0,72	0,071	0,073
		Trigonelina	0,038	0,60	0,18	0,069	0,059
		A. clorogénico	0,057	0,94	0,79	0,000	0,000

SEC: Error estándar de calibración; R2: Coeficiente de determinación; VR: Varianza residual; SEV: Error estándar de validación; SEV(C): Error estándar de validación después de calibración.

Finalmente se puede concluir que:

- Los resultados mostraron que la implementación de la técnica de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS), mediante el uso de equipos portátiles, ofrece ventajas similares a los equipos de laboratorio en cuanto repetibilidad espectral y exactitud, tanto para café verde y tostado.
- Se estableció la clasificación de cinco localidades en ensayo regional, con materiales del Programa de Mejoramiento Genético, basados en la distancia de Mahalanobis, con clasificaciones superiores al 83% en café verde y del 87% en café tostado.
- El error global de clasificación fue del 3% y 7% para las materias primas café verde y café tostado, respectivamente, usando el equipo portátil y el NIRS de mesa.
- Las ecuaciones de calibración presentaron mejor ajuste para los compuestos cafeína y trigonelina en café verde y cafeína y ácidos clorogénicos, en café tostado.
- El proceso de calibración NIRS debe considerar un número significativo de muestras que representen la mayor variabilidad posible del compuesto objeto de análisis, y que los métodos de determinación por química analítica cumplan los criterios de repetibilidad, exactitud, un bajo error de laboratorio, insumo fundamental para el desarrollo de ecuaciones de predicción NIRS.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan agradecimientos al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación otorgada en marco del

proyecto del Genoma de Café; al Departamento de Producción Animal de la Universidad de Córdoba (España) por la acogida durante la pasantía realizada. Igualmente, al personal de campo y coordinadores de las Estaciones Experimentales de Naranjal, Paraguicito, El Rosario, El Tambo y Pueblo Bello.

LITERATURA CITADA

1. AKINAGA, T.; YONEMORI, S.; KAWASAKI, S.; TANABE, T. Evaluation of tomato quality on tree and after harvesting using portable NIR spectroscopy. *Journal of the society of agricultural structures* 114:23-32. 2009.
2. ALVES, R.C.; CASAL, S.; ALVES, M.R.; OLIVEIRA, M.B. Discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their tocopherol profiles. *Food chemistry* 114(1):295-299. 2009.
3. ANDERSON, K.A.; SMITH, B.W. Chemical profiling to differentiate geographic growing origins of coffee. *Journal of agricultural and food chemistry* 50(7):2068-2075. 2002.
4. BERTRAND, B.; VAAST, P.; ALPIZAR, E.; ETIENNE, H.; DAVRIEUX, F.; CHARMETANT, P. Comparison of bean biochemical composition and beverage quality of arabica hybrids involving Sudanese-Ethiopian origins with traditional varieties at various elevation in Central America. *Tree physiology* 26(9):1239-1248. 2006.
5. BERTRAND, B.; VILLARREAL, D.; LAFFARGUE, A.; POSADA, H.; LASHERMES, P.; DUSSERT, S. Comparison of the effectiveness of fatty acids, chlorogenic acids, and elements for the chemometric discrimination of coffee (*Coffea arabica* L.) varieties and growing origins. *Journal of agricultural and food chemistry* 56(6):2273-2280. 2008.
6. BLANCO O., R.; ARAZURI G., S.; DIEZMA I., B.; GARCÍA R., F.J. Aplicación de tecnología NIR portátil a la estimación de la concentración de azúcares en uva. Lugo : Congreso nacional y Congreso Ibérico agroingeniería, 2009.
7. BRIANDET, R.; KEMSLEY, E.K.; WILSON, R.H. Approaches to adulteration detection in instant coffees using infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of the science of food and agriculture* 71:359-366. 1996.

8. CHARLTON, A.J.; FARRINGTON, W.H.; BRERETON, P. Application of ¹H NMR and multivariate statistics for screening complex mixtures: Quality control and authenticity of instant coffee. *Journal of agricultural and food chemistry* 50(11):3098-3103. 2002.
9. DAVIREUX, F.; MANEZ, J.C.; DURAND, N.; GUYOT, B. Determination of the content of six major biochemical compounds of green coffee using NIRS. *Proceedings of the international conference: Near infrared spectroscopy*, 2004.
10. DOWNEY, G.; BOUSSION, J. Authentication of coffee beans variety by near-infrared reflectance spectroscopy of dried extract. *Journal of the science of food and agriculture* 71(1):41-49. 1996.
11. ESTEBAN D., I.; GONZÁLEZ S., J.M.; PIZARRO, C. Characterization of arabica and robusta coffee varieties by NIRS. *Analytica chimica acta* 514(1):57-67. 2004.
12. HAIDUC, A.; GANCEL, C.; LELOUP, V. NIR-based determination of differences in green coffee chemical composition due to geographical origin. Montpellier : ASIC, 2006.
13. HUCK, C.W.; GUGGENBICHLER, W.; BONN, G.K. Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. *Analytica chimica acta* 538(1):195-203. 2005.
14. INFRASOFT INTERNATIONAL LLC. *Isi windows: Near-infrared software WinISI III*. 2002.
15. KEMSLEY E.K.; RUAULT S.; WILSON R. H. (1995). Discrimination between coffee arabica and Coffea canephora variant robusta beans using infrared spectroscopy. *Food Chemistry* , 54, 321 - 326.
16. KY C. -L. LOUARN J., DUSSERT S., GUYOT B., HAMONA S. AND NOIROT M. (2001). Caffeine, trogonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild Coffea arabica L. and C. Canephora P. accessions. *Food chemistry* , 223 - 230.
17. MYLES, ANTHONY J.; ZIMMERMAN, TYLER A.; BROWN, STEVEN D. (2006). Transfer of Multivariate Classification Models between laboratory and process Near Infrared spectrometers for the discrimination of green arabica and robusta coffee beans. *Applied spectroscopy* , 10, 1198 - 1203.
18. PAZ, P., SÁNCHEZ, M. T., PÉREZ-MARÍN, D., GUERRERO, J. E., & GARRIDO-VARO, A. (2009). Evaluating NIR instruments for quantitative and qualitative assessment of intact apple quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 89(5), 781-790.
19. PRODOLLIET, J., BAUMGARTNER, M., MARTIN, Y. L., & REMAUD, G. (1997). Determination of the Geographic Origin of Green Coffee by stable isotope techniques. In *COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFE* (Vol. 17, pp. 197-200). ASIC ASSOCIATION SCIENTIFIQUE INTERNATIONALE.
20. RUBAYIZA, A. B., & MEURENS, M. (2005). Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by Fourier transform Raman spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(12), 4654-4659.
21. SERRA, F., GUILLOU, C. G., RENIERO, F., BALLARIN, L., CANTAGALLO, M. I., WIESER, M., & VANHAECKE, F. (2005). Determination of the geographical origin of green coffee by principal component analysis of carbon, nitrogen and boron stable isotope ratios. *Rapid communications in mass spectrometry*, 19(15), 2111-2115.
22. SHENK, J. WESTERHAUS M. (1993). Near Infrared reflectance analysis with single and multiproduct calibrations. *Crop Science* , 33, 582 - 584.
23. SHENK, J.; WESTERHAUS M. (1995). Analysis of agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Monograph. Port Matilda. Infrasoft International.