

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

UTILIZACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL
INFRARROJO CERCANO (NIRS) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SEMILLAS
DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS Y MALEZAS OBJETABLES

por

Pablo DOMÍNGUEZ DE SANCTIS

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.
(Orientación Agrícola – Ganadera)

MONTEVIDEO
URUGUAY
2005

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:

Director: _____
Ing. Agr. Wilson Hugo

Ing. Agr. Enrique Estramil

Ing. Agr. Ana Tardáguila

Fecha: _____

Autor: _____
Pablo Domínguez De Sanctis

AGRADECIMIENTOS.

A mi esposa, familia y amigos por apoyarme en todo momento durante la realización de este trabajo.

A Daniel Bayce por ofrecerme el trabajo de tesis, presentarme en INIA La Estanzuela y por hacer posible mi participación en diversos cursos y congresos referidos al tema semillas y también por sus correcciones al trabajo.

A Wilson Hugo por su asesoramiento, orientación y corrección del trabajo. Por impulsar y hacer posible la presentación de los resultados parciales de la tesis en forma de trabajos científicos en el 27th Congreso Internacional de Análisis de Semillas (ISTA) Budapest – Hungría.

A Caisiv Rostan y Silvia González por su colaboración durante los trabajos de purificación de semillas.

A Miguel, Luis, Clavijo, a todo el personal de la Planta de Procesamiento de Semillas por la asistencia prestada en la etapa de campo.

A Juan Mieres y Laura Assandri especialmente por la disposición de su tiempo en el manejo del instrumento NIRS.

A Graciela Vila y Alejandra Díaz por su ayuda en la búsqueda de información bibliográfica.

Al “Programa de Apoyo al Sector de Semillas” Contrato N° URY/B7 – 310/98/0570-0 en la asistencia económica para la presentación de los resultados parciales del trabajo en el 27th Congreso Internacional de Análisis de Semillas (ISTA) Budapest – Hungría.

A la empresa Agar Cross Uruguay S. A por brindar su información de análisis de lotes de semillas.

A Paola Roncagliolo por su colaboración e información sobre el análisis de semillas.

A Ana Tardáguila por su colaboración en la corrección del trabajo.

A la Estación Experimental INIA La Estanzuela y a Facultad de Agronomía por permitir la realización de esta tesis.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
<u>PÁGINA DE APROBACIÓN</u>	II
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	III
<u>LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES</u>	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. SEMILLAS DE MALEZAS OBJETABLES	3
2.2. TECNOLOGÍA NIRS	10
<u>2.1.1. Aspectos básicos</u>	12
<u>2.1.2. Bases físicas y químicas</u>	13
<u>2.1.3. Instrumentos</u>	16
<u>2.1.4. Desarrollo de calibraciones</u>	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 EXPERIMENTO 1: DETERMINAR LA CAPACIDAD DEL NIRS EN RECONOCER A NIVEL DE ESPECIE LAS DIFERENTES SEMILLAS DE MALEZAS OBJETABLES Y LEGUMINOSAS FORRAJERAS	20
<u>3.1.1. Semillas de malezas objetables</u>	21
3.1.1.1. Colecta	21
3.1.1.2. Trilla.....	21
3.1.1.3. Limpieza	23
<u>3.1.2. Semillas de cultivos de leguminosas forrajeras</u>	23
<u>3.1.3. Instrumento NIRS</u>	24
<u>3.1.4. Metodología de análisis</u>	24
3.2. EXPERIMENTO 2: DETERMINAR LA CAPACIDAD DEL NIRS DE CUANTIFICAR SEMILLAS DE MALEZAS OBJETABLES EN SEMILLAS DE TRÉBOL BLANCO	25
<u>3.2.1. Semillas de malezas objetables</u>	25
<u>3.2.2. Semillas de trébol blanco</u>	25
<u>3.2.3. Metodología de análisis</u>	26
4. RESULTADOS Y DISCUSION	27
4.1. RESULTADOS EXPERIMENTO 1.....	27
4.2. RESULTADOS EXPERIMENTO 2.....	31
5. CONCLUSIONES	40
6. RESUMEN	41
7. BIBLIOGRAFIA	43
8. ANEXOS	46

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro N°

	Página
Cuadro 1. Malezas objetables para las especies de trébol rojo, trébol blanco, lotus y alfalfa.	4
Cuadro 2. Normas de calidad para las diferentes categorías de semillas de alfalfa, trébol blanco, trébol rojo y lotus.	6
Cuadro 3. Porcentajes de lotes de semillas de <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Lotus pedunculatus</i> , <i>Trifolium repens</i> , <i>Trifolium pratense</i> y <i>Medicago sativa</i> que contienen semillas para cada maleza objetable según el análisis de laboratorio luego de una maquinación severa. INIA	7
Cuadro 4. Porcentajes de lotes ofrecidos de semillas de <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Lotus subbiflorus</i> , <i>Trifolium repens</i> y <i>Trifolium pratense</i> que contienen semillas para cada maleza objetable según análisis de laboratorio de la empresa. Agar Cross Uruguay S.A.....	8
Cuadro 5. Caracterización de las principales bandas de absorción en el infrarrojo cercano (Cozzolino, 1998 a).	15
Cuadro 6. Especies utilizadas en el experimento 1.	20
Cuadro 7. Muestras de 2 gramos de trébol blanco con diferentes contaminaciones (% en peso) de semillas de maleza objetable.....	26
Cuadro 8. Resultados de la ecuación de calibración para todas las especies.	27
Cuadro 9. Resultados de la validación externa.....	29
Cuadro 10. Resultado de las 15 ecuaciones de calibración y validación externa desarrolladas con las muestras de trébol blanco + semillas de malezas objetables.....	31

Figura N°

Figura 1. Posición del infrarrojo cercano en el espectro electromagnético.....	12
Figura 2. Ejemplo de absorción infrarroja de una muestra de semillas.....	13
Figura 3. Interacción de la luz con la materia.	13
Figura 4. Esquema de funcionamiento de la tecnología NIRS(Cozzolino,1998a).	15
Figura 5. Espectro de trigo (9,5% agua, 11% proteína) a 3 diferentes tamaños de partícula. (William, 2001).	16
Figura 6. Foto de semillas de diferentes malezas objetables, prohibidas y cultivos forrajeros de leguminosas.....	22
Figura 7. Instrumento NIRS.....	24
Figura 8. Espectros de las muestras analizadas para la identificación de semillas.....	27
Figura 9. Residuales para cada muestra utilizada en el set de calibración.	28
Figura 10. Residuales entre predicciones del NIRS y números de referencia para cada especie.	29
Figura 11. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Echium plantagineum</i> (Flor morada) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 6).	32
Figura 12. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Ammi majus</i> (falsa viznaga) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 7).	32
Figura 13. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Plantago myosurus</i> (llantén chico) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 8).	33

Figura 14. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Coleostephus myconis</i> (margarita de Piria) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 9).....	33
Figura 15. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Apium leptophyllum</i> (apio cimarrón) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 10).	34
Figura 16. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Ammi viznaga</i> (viznaga) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 11).....	34
Figura 17. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Plantago lanceolata</i> (llantén grande) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 12).	35
Figura 18. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Silene gallica</i> (calabacilla) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 13).....	35
Figura 19. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Carduus acanthoides</i> (cardo chileno) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 14).	36
Figura 20. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Centaurea calcitrapa</i> (abrepuño) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 15).	36
Figura 21. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Anthemis cotula</i> (manzanilla) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 16).	37
Figura 22. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Rumex crispus</i> (lengua de vaca) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 17).	37
Figura 23. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Rumex conglomeratus</i> como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 18).....	38
Figura 24. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Cirsium vulgare</i> (cardo negro) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 19).	38
Figura 25. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con <i>Rumex pulcher</i> (lengua de vaca) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 20).	39

1. INTRODUCCIÓN

La identificación y cuantificación de semillas de malezas es de carácter relevante en el análisis de lotes de semillas. Es una tarea delicada y se requiere particularmente del conocimiento de la identidad de las mismas por parte del analista y de tiempo para llevarlo a cabo. Es un proceso que si se realiza en forma equivocada puede perjudicar económicamente a quien adquiera la semilla y a quien sea responsable de emitir el análisis correspondiente.

Durante los procesamientos de semillas se envían muestras al laboratorio para determinar si el lote esta siendo adecuadamente procesado para cumplir con los estándares y poder ser comercializado. Estos análisis de rutina son de suma importancia para la seguridad en la calidad de las semillas procesadas y pueden detener el procesamiento dado el tiempo que insumen.

Las semillas de malezas objetables de los principales cultivos de leguminosas forrajeras se caracterizan por ser difíciles de separar en los procesamientos de semillas, difíciles de erradicar en un predio y por ser de fácil propagación en cultivos. Por todos estos motivos su tolerancia en lotes de semilla “certificada” es mucho menor que las malezas comunes. Tener un sistema de control rápido durante el procesamiento sería de enorme utilidad, así como permitiría mayor número de controles durante el proceso de purificación.

La Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) es una técnica de análisis rápida y no destructiva. Su uso se fundamenta en el hecho de que si se irradia con un haz de luz monocromática la superficie de los materiales orgánicos, estos absorben una determinada cantidad de energía en función de la naturaleza de los enlaces y cargas electrostáticas existentes entre sus átomos y moléculas, la cual en el campo de la espectroscopía NIRS, puede expresarse a partir de la reflectancia ($\log 1/R$), obteniéndose como resultado un espectro, característico de cada material, el cual es reflejo, en definitiva, de la composición química, física y/o sensorial del material analizado.

Esta característica del análisis se ha explotado ampliamente, ya que ha permitido asociar espectros con composición química con asombrosa precisión. El espectro representa una suerte de “huella dactilar” para cada muestra, permitiendo también diferenciar materiales sin necesidad de conocer su composición química.

Durante la última década esta tecnología se ha utilizado considerablemente, incrementándose su empleo para el análisis de alimentos y productos agrícolas. Sin embargo en la identificación de semillas su uso es casi nulo.

Considerando que las semillas de las diferentes especies tienen distintos componentes químicos y por ello diferentes espectros en el NIRS, es que se plantea este trabajo de tesis, que tiene como objetivo analizar la utilización de la tecnología NIRS en el análisis de semillas. Para esto se plantearon dos experimentos:

Experimento 1: Determinar la capacidad del NIRS para reconocer a nivel de especie las diferentes semillas de leguminosas forrajeras y malezas objetables.

Experimento 2: Determinar la capacidad del NIRS de cuantificar semillas de malezas objetables en semillas de trébol blanco.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. SEMILLAS DE MALEZAS OBJETABLES

La identificación de semillas de malezas es de interés en las actividades agrícolas, especialmente en el examen de semillas cultivadas, de forma de prevenir la diseminación de las malezas por la adquisición de semillas contaminadas.

Las semillas de malezas se dividen en prohibidas, objetables y toleradas (o comunes). Las objetables y comunes se diferencian de las primeras en que se toleran (% máximo o en número máximo), según categoría y cultivo. La expresión “semillas objetables” se aplica a la semilla de especies que ocasionan perjuicios a la agricultura por ser difíciles de separar en los procesamientos de semillas, difíciles de erradicar en un predio y por ser de fácil propagación en un establecimiento (Pritsch, 1993) Por todos estos motivos su tolerancia en lotes de semilla certificada es mucho menor que las malezas comunes.

La nomina de malezas objetables según Resolución del Ministerio de Agricultura y Pesca de fecha 3/9/1984, en lo que respecta a la fijación de normas específicas de certificación para las especies forrajeras utilizadas en este trabajo (trébol rojo, trébol blanco, lotus y alfalfa) se resumen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Malezas objetables para las especies de trébol rojo, trébol blanco, lotus y alfalfa.

Malezas objetables		Especie Forrajera			
Nombre científico	Nombre Vernáculo	<i>Trifolium pratense</i> (Trébol rojo)	<i>Trifolium repens</i> (Trébol blanco)	<i>Lotus spp</i>	<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)
<i>Lolium temulentum</i>	Joyo	X	X	X	X
<i>Rumex spp</i>	Lengua de vaca	X	X	X	X
<i>Carduus spp</i>	Cardo	X	X	X	X
<i>Carthamus spp</i>	Cardo	----	X	----	----
<i>Sylibum spp</i>	Cardo	X	X	X	X
<i>Cynara spp</i>	Cardo	X	X	X	X
<i>Melilotus indicus</i>	Trébol de olor	X	X	X	X
<i>Ammi viznaga</i>	Viznaga	X	X	X	X
<i>Ammi majus</i>	Falsa viznaga	X	X	X	X
<i>Apium leptophyllum</i>	Apio cimarrón	X	X	X	X
<i>Plantago spp</i>	Llanten	X	X	X	X
<i>Echium plantagineum</i>	Flor morada	X	X	X	X
<i>Anthemis cotula</i>	Manzanilla	X	X	X	X
<i>Solanum spp</i>	Tutía	X	X	X	X
<i>Centaurea spp</i>	Abrepuños	X	X	X	X
<i>Silene gallica</i>	Calabacilla	----	X	----	----
<i>Brassica spp</i>	Nabo	X	X	X	----
<i>Convolvulu spp</i>	Corriguela	X	----	----	----
<i>Polygonum convulvulus</i>	Enredadera negra	X	----	----	----
<i>Coleostephus myconis</i> (*)	Margarita de Piria	X	X	X	X

X – Los casilleros con la cruz indican que la maleza es objetable para ese cultivo.

* – Si bien es objetable su tolerancia máxima es 0(cero) según Res. Ministerial N°428/993 (30/06/993) y se la declaró plaga nacional de la agricultura (decreto 226/04).

La metodología de análisis de semilla se ha estandarizado internacionalmente. En 1924 se funda en Cambridge, Inglaterra, la Asociación Internacional para el Ensayo de Semillas (ISTA), con sede en Zurich, Suiza. Su principal objetivo es desarrollar, adoptar y publicar los procedimientos estandarizados para el análisis de semillas. ISTA realiza la descripción detallada de la metodología de análisis en cada especie. Uruguay es país miembro de esta asociación y los análisis de semillas se realizan de acuerdo con sus reglas (Ley N°16.811).

Según los análisis descriptos por ISTA, la muestra representativa del lote de semillas es dividida en el laboratorio para obtener: a) la muestra de trabajo para el análisis de pureza, y b) muestra de trabajo para la determinación del número de otras semillas (ej. malezas objetables, prohibidas y otros cultivos). El tamaño de muestra para el análisis de pureza (ítem a) se ha calculado de forma que contenga por lo menos 2500 semillas. Por ejemplo 2gr para trébol blanco, 3gr para lotus, 5gr para trébol rojo al igual que para alfalfa y 6gr para trébol alejandrino. La muestra destinada para la determinación en número de otras semillas (ítem b) es diez veces mas grande que la muestra para el análisis de pureza (ej. 20grs para trébol blanco; 30gr para lotus; 50gr para trébol rojo o alfalfa y 60gr para trébol alejandrino).

La Ley de Semillas N°16.811 promulgada en febrero de 1997, crea al Instituto Nacional de Semillas (INASE) como persona jurídica de derecho público no estatal, el que tiene, como uno de los objetivos, fiscalizar el cumplimiento de la normativa legal en la materia y proponer el dictado de normas sobre producción, certificación, comercialización, exportación e importación de semillas así como sobre la protección de las creaciones y los descubrimientos fitogenéticos (Ley N°16.811).

Existen dos métodos de etiquetar semillas en el mundo.

- a. Etiqueta Verdad
- b. Mínimos estándares

En el primero, se escribe en la etiqueta todo lo que tiene el lote de semillas, sin límites de calidad. Este sistema se utiliza en muy pocos países.

El sistema de mínimos estándares, adoptado en Uruguay, especifica cuál es el mínimo de calidad que puede tener un lote de semilla, en cada especie y para cada característica de la calidad (germinación, pureza, malezas, materia inerte, otros cultivos).

En el cuadro 2 se pueden apreciar las normas de calidad para las categorías de semilla Fundación, Registrada, Certificada y Comercial para las especies forrajeras de trébol rojo, trébol blanco, lotus y alfalfa en Uruguay.

Cuadro 2. Normas de calidad para las diferentes categorías de semillas de alfalfa, trébol blanco, trébol rojo y lotus.

	Fundación				Registrada				Certificada				Comercial			
	A.	T. b	T. r	L.	A.	T. b	T. r	L.	A.	T. b	T. r	L.	A.	T. b	T. r	L.
S. p (% mínimo)	99	99	99	99	99	99	99	99	98	98	98	98	95	95	95	95
S. m (% máximo)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	1(*)	1(*)	1(*)	1(*)
M. o (Nº máximo por kg.)	45	90	45	90	90	180	90	180	180	360	180	360				
M. p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. i (% máximo)	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	5	5	5	5
S. o. c (% máximo)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5	0,5	0,5	5	5	5	5
T. o (Nº máximo por kg.)	20	50	20	20	90	180	90	90	180	360	180	360				
T. o (% máximo)													0,5%	0,5%	0,5%	0,5%
G. t (% mínimo)	85	85	85	80	85	85	85	80	85	85	85	80	80	80	80	75

Fuente: Cuadro elaborado en función a los artículos 20°, 22°, 24°, 26° de las normas específicas de certificación, capítulos IX, X, XI y XII, Resolución Ministerial de Agricultura y Pesca de fecha 3 de setiembre de 1984 y en función al artículo 51°, capítulo IX, Decreto 438/004.

(*) incluye trébol de olor; A.: alfalfa; T. b: trébol blanco, T. r: trébol rojo; L.: lotus; S. p: semilla pura; S. m: semilla de malezas; M. o: malezas objetables; M. p: malezas prohibidas; M. i: materia inerte; S. o. c: semillas de otros cultivos; T. o: trébol de olor; G. t: germinación total incluyendo semillas duras

Como se puede observar en el cuadro 2, las normas de calidad son menos rigurosas hacia la categoría comercial. En esta última no se establecen tolerancias específicas para las semillas de malezas objetables pero si para malezas en general. El 95% de la semilla forrajera que se comercializa en Uruguay es categoría comercial (comunicación personal Wilson Hugo).

La determinación en número de las semillas de malezas objetables se realiza en las categorías de semilla Fundación, Registrada y Certificada.

En la producción de “semillas finas” del país, generalmente el producto cosechado contiene semillas de malezas. El control de las mismas en las especies forrajeras es aún más difícil de realizar que en los cultivos para grano, por eso los semilleros totalmente libres de malezas son relativamente escasos, por lo que el procesamiento riguroso es el método capaz de asegurar la disponibilidad de “semillas finas” de alta pureza física.

Existen malezas cuya eliminación es más difícil que otras y que a su vez esta separación es más difícil en algunos cultivos que en otros, por lo que es de esperar encontrarlas en el análisis de laboratorio y en especial determinadas malezas según el cultivo analizado.

Stagno (1979) identificó las semillas de malezas objetables que particularmente son problema para cada cultivo forrajero luego de su rigurosa maquinación, es decir que aún presentan semillas de malezas en el análisis de laboratorio. Son ejemplo las semillas

de *Silene gallica* (calabacilla), *Anthemis cotula* (manzanilla) en lotes de trébol blanco; *Plantago spp.* (llantén) en lotus y *Rumex spp.* (lengua de vaca) en trébol rojo y alfalfa.

En el laboratorio de la Sección Semillas de INIA La Estanzuela se procesó la información de los análisis finales de semillas para los años comprendidos entre 1993 y 2002 de lotes de leguminosas forrajeras. Las mismas fueron maquinadas en la Planta de Procesamiento de Semillas de dicha institución. Los resultados se resumen en cuadro 3.

Cuadro 3. Porcentajes de lotes de semillas de *Lotus corniculatus*, *Lotus pedunculatus*, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense* y *Medicago sativa* que contienen semillas para cada maleza objetable según el análisis de laboratorio luego de una maquinación severa. INIA

	<i>L. corniculatus</i>	<i>L. pedunculatus</i>	<i>T. repens</i>	<i>T. pratense</i>	<i>M. sativa</i>
Malezas objetables					
<i>Rumex spp.</i>	13	7	4	23	15
<i>Ammi spp.</i>	1			5	7
<i>Apium leptophyllum</i>		4			
<i>Plantago lanceolata</i>	21	21	12	28	20
<i>Plantago myosurus</i>	9	7	12		
<i>Echium plantagineum</i>	3		2		2
<i>Anthemis cotula</i>			10		
Cardos*	3			5	11
<i>Centaurea spp.</i>				3	1
<i>Brassica spp.</i>				3	
<i>Mellilotus indicus</i>	1				
<i>Silene gallica</i>		4	20	3	
Nº lotes procesados	75	28	50	40	91

Fuente: Laboratorio Sección Semillas INIA La Estanzuela.

* se consideran los cardos de los géneros: *Carduus*, *Sylibum*, *Cynara* y *Cirsium*.

El total de lotes que presentaron contaminación por semillas de malezas objetables para los diferentes cultivos fue el siguiente: 34% en alfalfa; 37% en lotus; 42% en trébol blanco y 47% en trébol rojo.

En el cuadro 3 se puede observar que ciertas malezas, por ejemplo *Plantago lanceolata* y *Rumex spp.* se encuentran en mayor porcentaje de los lotes y en todos los cultivos. También se destaca la contaminación de malezas en particular para cada cultivo como por ejemplo *Silene gallica* y *Anthemis cotula* en trébol blanco. Estos resultados de análisis finales para lotes de semillas forrajeras certificadas en INIA La Estanzuela evidencian que por mas riguroso que sea el control de las malezas a nivel de campo y en la maquinación del lote, igual aparezcan semillas de malezas objetables dependiendo del cultivo y tipo de maleza.

También se presentan resultados de análisis de Agar Cross Uruguay S.A. “AGROSAN”, una de las empresas semilleristas que comercializa un gran volumen de especies de leguminosas forrajeras en el país, representando mejor la problemática de la presencia de semillas de malezas objetables en lotes de semillas comercializadas en Uruguay.

En el laboratorio de semillas de esta empresa se procesó la información de los análisis de semillas para lotes de semillas de leguminosas forrajeras ofrecidos a la empresa (directamente de chacra o prelimpiadas por el productor u otra empresa), para los años comprendidos entre 1997 y 2005. El número total de lotes estudiados se presenta al final del cuadro 4.

El siguiente cuadro 4 resumen los porcentajes de lotes de semillas de leguminosas forrajeras que contienen semillas para cada maleza objetable según el análisis de laboratorio de la empresa.

Cuadro 4. Porcentajes de lotes ofrecidos de semillas de *Lotus corniculatus*, *Lotus subbiflorus*, *Trifolium repens* y *Trifolium pratense* que contienen semillas para cada maleza objetable según análisis de laboratorio de la empresa. Agar Cross Uruguay S.A

	<i>L. corniculatus</i>	<i>L. subbiflorus</i>	<i>T. repens</i>	<i>T. pratense</i>
Malezas objetables				
<i>Rumex spp.</i>	9	1	24	20
<i>Ammi spp.</i>	38	32	37	45
<i>Apium leptophyllum</i>	6	1	4	2
<i>Plantago lanceolata</i>	77	4	41	57
<i>Plantago myosurus</i>	3	6	13	1
<i>Echium plantagineum</i>	1	1		7
<i>Anthemis cotula</i>	5	1	17	4
<i>Carduus spp.</i>	5	1	7	13
<i>Centaurea spp.</i>	1	1		8
<i>Cirsium spp</i>	2	5		3
<i>Brassica spp.</i>	1			1
<i>Melilotus indicus</i>	2	1	2	3
<i>Silene gallica</i>	25	8	35	9
Nº lotes procesados	1332	105	46	287

Fuente: Laboratorio Agar Cross Uruguay S.A

En el cuadro 4 se observa que las malezas *Plantago lanceolata*, *Rumex spp*, *Ammi spp.* y *Silene gallica* se encuentran en mayor porcentaje de lotes con respecto a las otras malezas.

También se pueden clasificar las malezas objetables de acuerdo a su mayor y menor incidencia para cada cultivo. Por ejemplo en *Lotus corniculatus* se destaca *Plantago lanceolata* como la mas importante, siguiendo *Ammi spp*, *Silene gallica* y *Rumex spp*. En trébol rojo se destaca *Rumex spp*, siguiendo *Plantago lanceolata*, *Ammi spp*, *Echium plantagineum* y *Silene gallica*. Trébol blanco a diferencia con trébol rojo presenta mayor contaminación por *Silene gallica*.

Los resultados demuestran que ciertas semillas de malezas objetables son particularmente problemáticas en determinadas especies de leguminosas forrajeras. La conclusión principal es que en los últimos años los lotes procesados en todo el país, tanto en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA - La Estanzuela) que produce semillas básicas, y en una de las empresas que comercializa un gran volumen de semillas en el Uruguay, un alto porcentaje están contaminados con semillas de malezas objetables a la entrada del procesamiento.

2.2. TECNOLOGÍA NIRS

La aplicación de la Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS, sigla en inglés), se emplea desde la década del 70 para los análisis de productos de las industrias de alimentos, farmacéutica, bioquímica y petroquímica, como alternativa a los métodos químicos y químico-biológicos tradicionales (Alomar et al, 1998; Cozzolino, 2002).

El éxito del NIRS puede atribuirse en gran parte a su habilidad para realizar análisis rápidos cuantitativos y cualitativos de muchos componentes en una muestra con un mínimo de preparación. Es un análisis no destructivo ni contaminante debido a que no hace uso de reactivos químicos. El método utiliza un haz de luz de longitudes de onda entre los 700 y 2500 nanómetros que representa la región del infrarrojo cercano del espectro electromagnético.

Uno de los primeros reportes que aparece en la literatura relacionados con el NIRS data de 1934 (Shenk et al, 1994).

La segunda guerra mundial promueve la expansión de la tecnología del infrarrojo como una herramienta de análisis, especialmente para productos derivados del petróleo (McClure, 2001).

El desarrollo más importante de la tecnología en la industria alimenticia se debe a los trabajos de Karl Norris y colaboradores en la década de los 60. Norris fue uno de los pioneros en reconocer el potencial del NIRS para el análisis químico rápido de los productos agrícolas, sugiriendo el análisis de proteína, humedad y aceite en granos con determinadas longitudes de ondas. (Shenk et al, 1994; Cozzolino, 1998 a).

Esta técnica no solo es utilizada para determinar la composición química de un producto, sino que además permite la determinación de propiedades físicas (tamaño de partícula, dureza), de características microbiológicas (contaminación por hongos), de parámetros sensoriales (color, sabor y olor), etc. (Varo et al, 2000).

La determinación de proteína y humedad en granos de trigo y cebada es por lejos una de las primeras y actuales aplicaciones del NIRS en la industria (Cozzolino, 1998 a). Se utiliza ampliamente en otros granos también como por ejemplo en maíz, girasol, soja y canola para la determinación de carbohidratos, proteína, aceites, etc.

Otras aplicaciones son para la determinación de calidad de forrajes, concentrados y ensilajes (Shenk, et al 1994; Cozzolino, et al 2001); en la identificación de harinas de origen animal y en harinas de origen vegetal (Cozzolino, 2002); en la determinación de calidad de carne (Cozzolino, 1998 b) y en la autenticación de productos tales como jugos de naranja, variedades de café, mezclas de aceites (Downey, 1996 a).

La evaluación de elementos minerales (fósforo, potasio, azufre, magnesio, calcio) vía NIR en tejidos foliares también ha sido objeto de estudios (Morón y Cozzolino, 2001)

Por la diversidad de trabajos encontrados en la literatura especializada a la fecha, se podría decir que las aplicaciones limitan con la imaginación. Existen numerosos ejemplos en la bibliografía sobre las aplicaciones del NIRS en el análisis cuantitativo de parámetros químicos de los alimentos y productos agrícolas.

Sin embargo los trabajos relacionados a la identificación de semillas mediante el NIRS son escasos. Osborne en 1993 efectuó la identificación de variedades de trigo (Varo, 2000). Paulsen (2002) identificó semillas de maleza en lotes de semillas de trigo; W. Hugo y D. Cozzolino (2000) utilizaron el NIRS en la detección de semillas de *Cúscuta* (*Cúscuta spp.*) en lotes de Trébol rojo y Trébol blanco.

Otras aplicaciones importantes del NIRS en calidad de semillas son: el trabajo de Baker (1999) quien detectó larvas de gorgojo (*Sitophilus oryzae*) en granos de trigo con un 95 % confianza; Cavelier (1995) detectó en semillas de trigo grados de infección producidos por *Septoria nodorum* Berk. con un 91% de confianza; Pigeon (2000) determinó la concentración de sustancias insecticidas (tefluthrin e imidacloprid) en semillas de trigo y cebada; Velasco (1997) estimó el peso de 1000 semillas de *Brassica carinata*. Lestander (2002) clasificó por medio del NIRS semillas viables y no viables de *Pinus sylvestris* con un 98% de confianza. Min (2004) clasificó y separó semillas viables y no viables de *Raphanus sativus* L.

Aplicaciones novedosas de la tecnología NIRS son por ejemplo: la predicción del sexo de larvas vivas de gusanos de seda, así como de larvas muertas, mientras se encuentran dentro de sus capullos (Alomar, 1998).

2.1.1. Aspectos básicos

La Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS), es una técnica que se basa en la interacción entre la luz infrarroja y la materia.

Entendemos por luz infrarroja cercana, la zona del espectro electromagnético situada al final de la zona visible y al comienzo de la zona infrarroja media (Fig. 1).

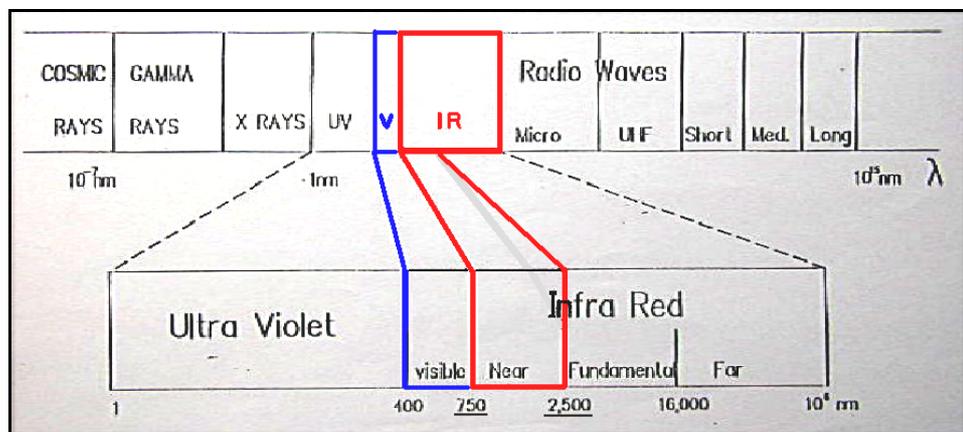


Figura 1. Posición del infrarrojo cercano en el espectro electromagnético

(Lister, 1994 citado por Cozzolino, 1998 b).

Como muestra la figura 1 la región del infrarrojo cercano se ubica entre las longitudes de onda de 700 y 2500 nanómetros (nm) del espectro electromagnético.

La medida fundamental que se obtiene de la interacción entre la radiación electromagnética (región NIR) y las moléculas de una muestra es el espectro infrarrojo.

Los espectros infrarrojos están constituidos por la representación gráfica de la energía absorbida en función de la longitud de onda (Fig. 2).

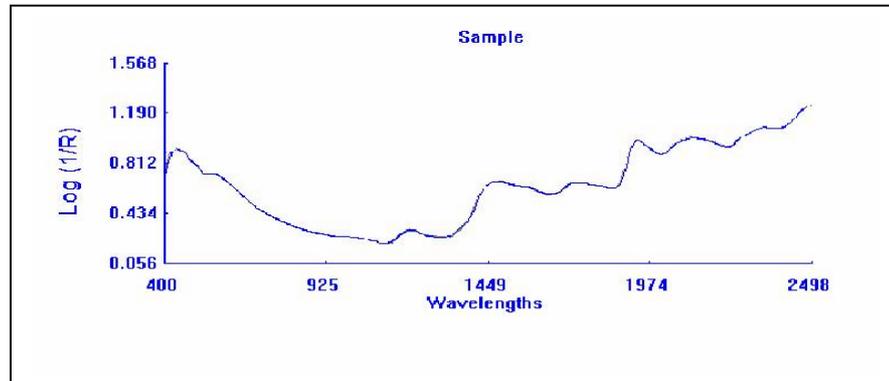


Figura 2. Ejemplo de absorción infrarroja de una muestra de semillas.

El conjunto de valores a diferentes longitudes de ondas para una muestra dada, constituye su espectro que representa una suerte de “huella dactilar” de esa muestra.

El espectro es característico de cada material, el cual es reflejo, en definitiva, de la composición química, física y/o sensorial del material analizado.

Según Smith (1999) el mayor potencial del espectro es que permite identificar lo no conocido, confirmar identidades por comparación de espectros y la intensidad del espectro permite mediciones de concentraciones.

2.1.2. Bases físicas y químicas

La luz infrarroja penetra muestras sin preparación, modificación o dilución. Cuando la misma incide sobre una muestra (Fig. 3), esta puede sufrir diferentes fenómenos: absorción, transmisión y reflexión.

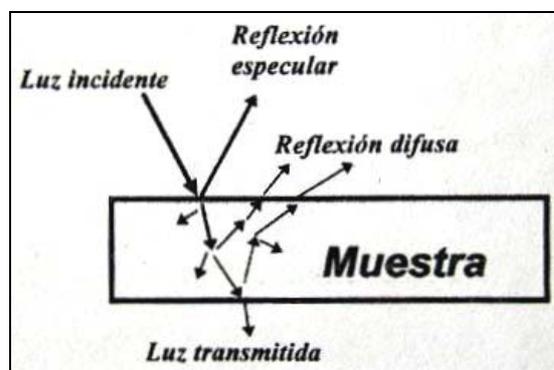


Figura 3. Interacción de la luz con la materia.

La radiación lumínica total reflejada por la muestra, es la suma de la reflexión especular (superficial) mas la reflexión difusa, que es aquella temporalmente absorbida y luego remitida por la muestra. Solo la reflexión difusa es la que entrega información útil acerca de la naturaleza o composición de la muestra. (Alomar, 1998).

La absorción de energía por la muestra produce que los enlaces entre carbono e hidrógeno (C-H), oxígeno e hidrógeno (O-H) y nitrógeno e hidrógeno (N-H), principales constituyentes de la estructura básica de las sustancias orgánicas, vibren en distinta forma (Alomar, 1998).

Al absorber energía, los enlaces de las moléculas vibran en dos formas fundamentales: 1) vibraciones de valencia (tensión o elongación), los átomos se aproximan y se alejan periódicamente sobre su eje común, lo que ocurre a frecuencias mas altas o menor longitud de onda; 2) vibraciones de deformación (torsión, flexión o tijera), se modifican los ángulos entre los enlaces de acuerdo con la estructura molecular (ocurre a frecuencias mas bajas o mayor longitud de onda). (Shenk y Westerhaus, 1994).

La absorción de luz se estima por diferencia entre la luz incidente y la reflejada o transmitida. La intensidad de la absorción de las moléculas en el NIRS puede ser descrita en términos de transmitancia o absorbancia. Se asume que ambos casos obedecen a la ley de Beer Lambert que establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional al número o concentración de moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación.

$$\text{Log } (I_0/I) = \log (1/T) = k c l = A$$

Donde: A: es absorbancia (densidad óptica); k: es la constante de la absorción molecular que es característica para cada molécula; c: es la concentración de moléculas; I: intensidad de la radiación transmitida; I₀: intensidad de la radiación incidente; T: transmitancia. En el NIRS esta ecuación se expresa en términos de reflectancia (R) tomando la forma de:

$$A = \log (1/R).$$

Los espectros de muestras solidas se colectan por reflectancia, en tanto que los de muestras líquidas, por transmitancia.

En el modo de transmisión se define absorbancia (A) como $\log (1/T)$, en tanto que en el modo de reflexión, A corresponde al $\log (1/R)$.

La luz difusa reflejada (R) por la muestra, es registrada por detectores, normalmente de sulfuro de plomo, amplificada, digitalizada, transformada en $\log 1/R$ y comunicada a un computador para su almacenamiento o procesamiento. En forma

paralela a la señal digital de luz reflejada, el computador recibe una señal que representa la longitud de onda utilizada, de modo que a cada valor de reflectancia le corresponde una longitud de onda, lo que permite el ulterior procesamiento de los datos.

El siguiente esquema ilustra de forma básica el funcionamiento de la tecnología NIRS para el modo de transmitancia o absorbancia (Fig. 4).

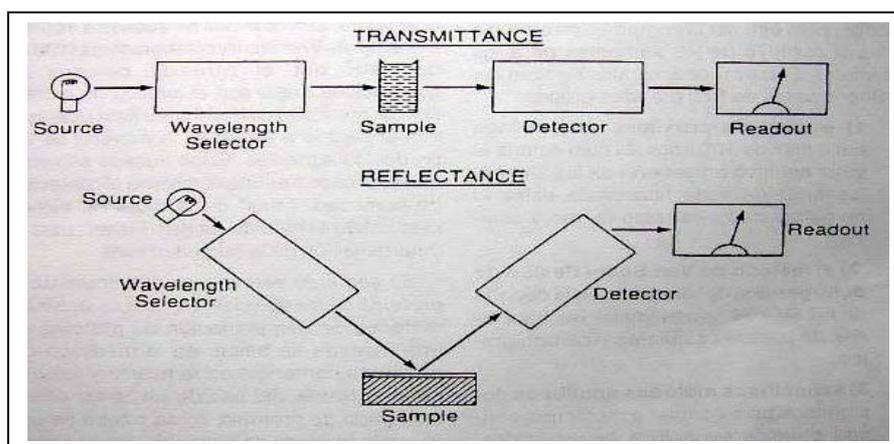


Figura 4. Esquema de funcionamiento de la tecnología NIRS(Cozzolino,1998a).

La información química en el espectro se encuentra en lugares específicos. Cada longitud de onda se relaciona con una estructura química definida, por ejemplo las absorciones moleculares de los O-H a 1410 y 1940 nm se relacionan con el contenido de humedad de la muestra (cuadro 5). Es aquí donde se encontrarían las altas correlaciones entre la química y el NIRS para cada componente (Cozzolino, 1998 a).

Cuadro 5. Caracterización de las principales bandas de absorción en el infrarrojo cercano (Cozzolino, 1998 a).

Longitud de onda (nm)	Entidad química
1410	O-H (agua)
1450	O-H (agua)
1510	N-H (proteína)
1725	- CH ₂ (lípidos)
1940	O-H (agua)
2140	C-H (lípidos)
2300	C-H (proteína)

Las propiedades físicas de la muestra como por ejemplo el tamaño de partícula afectan a todo el espectro como se puede observar en la figura 5.

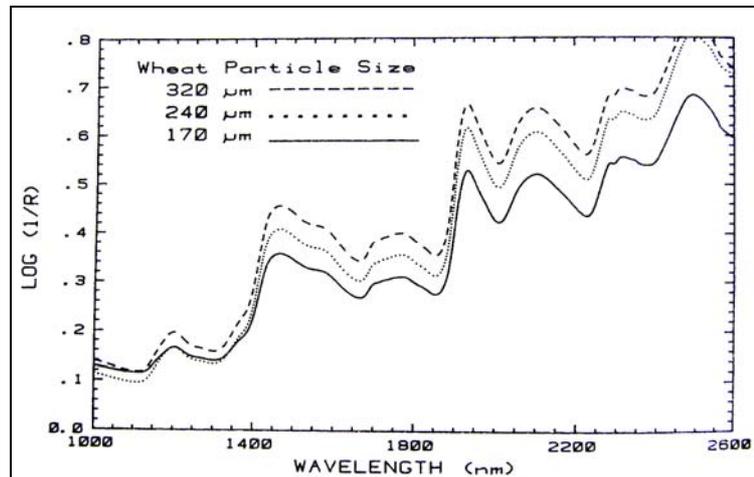


Figura 5. Espectro de trigo (9,5% agua, 11% proteína) a 3 diferentes tamaños de partícula. (William, 2001).

El tamaño de partícula de la muestra puede complicar el análisis cuantitativo (cuantificar entidades químicas de una muestra) por lo que se pueden utilizar factores matemáticos de corrección durante la calibración. La variación de tamaño de partícula puede ser un carácter relevante y clave para la identificación de diferentes materiales en el análisis cualitativo (Downey, 1996; Howard, 2001).

2.1.3. Instrumentos

A pesar de que la teoría del espectro infrarrojo (IR) se conoce por mas de 200 años no fue hasta 1930 en que se crea el primer instrumento (McClure, 2001).

Existen en el mundo diferentes tipos de instrumentos (espectrómetro) para obtener el espectro infrarrojo.

Según Cozzolino (1998 a) existen dos tipos básicos de instrumentos, aquellos que poseen filtros y los monocromadores. Alomar (1998) describen los instrumentos de filtros o de interferencia, de filtros inclinables y los monocromadores de barrido que se describen a continuación:

1) De filtros fijos o de interferencia

Estos instrumentos se basan en el uso de filtros especiales que al ser iluminados por la fuente de luz, solo dejan pasar una longitud de onda. Al disponer de varios filtros que al desplazarse se interpongan en el camino seguido por la radiación, se pueden generar distintas longitudes de onda para irradiar la muestra. Estos equipos de filtros de interferencia, llevan entre 6 y 20 filtros montados en un dispositivo que permite cambiar fácilmente la posición y generar una longitud de onda específica. Son equipos útiles para análisis de rutina de sustancias poco complejas. Uno de los primeros equipos de este tipo que se comercializó, corresponde a un analizador de granos, dotado de 6 filtros, para la medición de agua (1940nm), carbohidratos (2100nm), proteína (2180nm) y aceite (2310nm).

2) De filtros inclinables

Estos instrumentos poseen varios filtros, 3 en los más simples y hasta 7 en los más complejos, los que se montan en un eje que al girar provocan una inclinación del filtro, cambiando el ángulo de la luz incidente sobre él, lo que cambia la longitud de onda que pasa a través. Con esto se pueden obtener muchas longitudes de onda, considerando al conjunto de filtros.

Los instrumentos de filtros inclinables se pueden usar al igual que los de filtros fijos, para generar longitudes de ondas fijas o como espectrofotómetros de barrido, con un rango limitado de longitudes de onda. Alomar (1998) cita como ejemplo un equipo de filtros inclinables con 7 filtros, que pueden generar un rango de barrido continuo entre 1380 y 2380nm.

3) Monocromadores de barrido

Utilizan el mismo concepto del modelo de filtros inclinables, sin embargo, en lugar de usar filtros, utilizan una especie de prisma (red de difracción) que provoca dispersión de la luz, generando diferentes longitudes de onda. Uno de los modelos más avanzados permite irradiar la muestra en el rango de 400 a 2500nm, es decir desde el espectro visible, hasta el final del NIR.

2.1.4. Desarrollo de calibraciones

El espectro producido por el instrumento NIRS representa las propiedades químicas y físicas de la muestra. Se puede obtener en segundos y con alta repetibilidad. Sin embargo solamente es útil cuando es interpretado junto con los métodos de referencia.

Al desarrollar una calibración NIRS, se relaciona la información espectral (óptica) con la información de la composición físico – química (método de referencia), definiendo el tratamiento matemático de los datos, el segmento del espectro a incluir y el método de regresión a emplear.

Para estimar la composición de una muestra, se requiere previamente hacer calibraciones, para lo cual se necesita contar con un conjunto amplio de muestras representativa de una misma población, coleccionar sus espectros, analizar las muestras mediante un método de referencia confiable, desarrollar las ecuaciones de calibración que relacionen los datos espectrales con los datos del método de referencia y, finalmente, validar dichas ecuaciones con otras muestras de la misma población general pero que no formen parte del set utilizado en la calibración.

La relación de los valores de $\log(1/R)$ y los valores del método estándar es expresada como una aproximación estadística y siempre se relacionan utilizando una ecuación de regresión. La ecuación de regresión así definida se integra de las constantes, de las variables independientes (combinaciones matemáticas de los $\log(1/R)$ a varias longitudes de ondas) y de una variable dependiente (el valor del método de referencia). (Shenk et al,1994; William, 2001).

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n$$

donde:

y: es la variable a determinar, representa el parámetro químico o característica de la muestra

x_1 a x_n : son los valores del $\log(1/R)$ a las diferentes longitudes de ondas

b_0 : es la ordenada en el origen.

b_1 a b_n : son los coeficientes de regresión

En la calibración un set de (x_n) e (y_n) son usados para estimar los coeficientes de regresión (b_n) mientras que en la validación un set de (x_n) y las estimaciones de los coeficientes son usados para estimar el (y) no conocido.

En el desarrollo de la ecuación, una de las primeras fases a atender, es detectar muestras que se consideren extrañas o aberrantes (en inglés referidas como outliers), que no encajan o corresponden a la calibración.

El software que se utiliza para desarrollar la calibración realiza una validación cruzada con las muestras empleadas (paso intermedio entre la calibración y validación externa). Este proceso realizado por el software consiste en subdividir el grupo de muestras en varios subgrupos, separando uno como si fuera un grupo de muestras “externas” para validación y generando con el resto una ecuación de calibración. Este proceso se repite hasta que todos los grupos de muestras han sido predichos a partir de los restantes, lo cual permite una mayor confiabilidad en la ecuación generada (Alomar, 1998).

La ventaja de la validación cruzada es que permite identificar muestras “outliers” (Shenk et al, 1994). El criterio para clasificar una muestra como “outlier” es el valor residual (desvío) entre el valor de predicción (NIRS) y el de referencia (laboratorio). Las muestras que presentan alto valor residual son eliminadas del set de calibración y la validación cruzada se vuelve a realizar (2 o 3 veces más) con el objetivo de mejorar la ecuación de predicción. El eliminar muestras extrañas durante la calibración del instrumento NIRS tiene como objetivo mejorar la ecuación de predicción pero también se corre el riesgo de no integrar parte de la población y por ende su no predicción.

La ecuación desarrollada mediante la calibración se considera mas confiable cuanto mayor sea su coeficiente de determinación (R^2) y menor su error estándar de calibración (SEC: “standard error of calibration). Una vez seleccionada una o mas ecuaciones, deben someterse a prueba con un grupo de muestras (set de validación) con el que se comprueba si los valores predichos obtenidos estiman con suficiente precisión el valor real de estas muestras.

Al predecir un set de muestras externas para validación, se calcula también un R^2 y con los desvíos de los valores predichos respecto de los valores de referencia, se calcula un error estándar de predicción o performance (SEP: “standard error of performance”). El SEP es un indicador confiable de la calidad de la ecuación desarrollada. Como criterio general se puede afirmar que una ecuación se puede considerar como aceptable cuando la magnitud del SEP es menor a un tercio de la desviación estándar de los datos de referencia (Alomar, 1998)

En este trabajo de tesis el objetivo de la calibración no fue cuantificar un componente químico sino clasificar especies diferentes sin necesidad de conocer con detalle la composición química de la muestra al igual que en los trabajos realizados para la identificación de cuscuta en semillas de trébol blanco y trébol rojo (W. Hugo y D. Cozzolino, 2000); y en la identificación de variedades de trigo (Varo, 2000).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de tesis se realizó en la Estación Experimental “Alberto Boerger” INIA, La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

En función de la revisión bibliográfica y los antecedentes de uso del NIRS en el análisis de semillas en La Estación Experimental INIA La Estanzuela es que se plantean los siguientes experimentos:

Experimento 1: Determinar la capacidad del NIRS para reconocer a nivel de especie las diferentes semillas de leguminosas forrajeras y malezas objetables.

Experimento 2: Determinar la capacidad del NIRS de cuantificar semillas de malezas objetables en semillas de trébol blanco.

3.1 EXPERIMENTO 1: DETERMINAR LA CAPACIDAD DEL NIRS EN RECONOCER A NIVEL DE ESPECIE LAS DIFERENTES SEMILLAS DE MALEZAS OBJETABLES Y LEGUMINOSAS FORRAJERAS

En este experimento se calibró al instrumento NIRS con semillas de especies distintas para su posterior predicción.

Las semillas de malezas objetables y cultivos de leguminosas forrajeras utilizadas en este experimento se detallan en el cuadro 6 y se pueden apreciar en la figura 6.

Cuadro 6. Especies utilizadas en el experimento 1.

Cultivos de leguminosas forrajeras	Malezas objetables
<i>Trifolium repens</i> L. (cv Zapican)	<i>Plantago lanceolata</i> L.
<i>Trifolium pratense</i> L. (cv. E 116)	<i>Plantago myosurus</i> Lam.
<i>Trifolium alexandrinum</i> Bory & Chaubard (cv. Calipso)	<i>Anthemis cotula</i> L.
<i>Medicago sativa</i> L. (mezcla: cv. E. Chaná y cv. Creoula)	<i>Echium plantagineum</i> L.
<i>Lotus corniculatus</i> L. (mezcla: cv. San Gabriel y cv. Inia Draco)	<i>Rumex crispus</i> L.
	<i>Rumex conglomeratus</i> Murr.
	<i>Rumex pulcher</i> L.
	<i>Apium leptophyllum</i> (Pers.) F. Muell.
	<i>Ammi viznaga</i> L.
	<i>Ammi majus</i> L.
	<i>Coleostephus myconis</i> (L.) Cass.
	<i>Carduus acanthoides</i> L.
	<i>Centaurea calcitrapa</i> L.
	<i>Cirsium vulgare</i> (Savi) Airy – Shaw (*)
	<i>Silene gallica</i> L.

(*) Si bien no figura en las normas como maleza objetable se la considera como tal.

3.1.1. Semillas de malezas objetables

3.1.1.1. Colecta

Las semillas de malezas se colectaron manualmente en el campo y se colocaron en bolsas de arpillera durante el período que comprende 20 /11/2002 a 20/1/2003 en los alrededores del INIA La Estanzuela - Dpto. Colonia. Previo a la cosecha se identificaron las plantas y semillas de malezas según caracterización de O. del Puerto, 1975; 1979; 1985; Marzocca, 1976 y Carambula, 1981; se herborizaron y fotografiaron con el objetivo de asegurar la determinación taxonómica de las mismas. En anexo 1 se pueden observar algunas fotos de las plantas de malezas objetables.

Las semillas de malezas colectadas fueron: *Echium plantagineum* L. (flor morada) *Plantago myosurus* Lam. (llantén chico), *Ammi visnaga* L. (viznaga), *Ammi majus* L. (falza viznaga), *Cirsium vulgare* (Savi) Airy-Shaw.(cardo negro), *Carduus acanthoides* L. (cardo chileno) *Centaurea calcitrapa* L. (abrepuños), *Silene gallica* L. (calabacilla), *Apium leptophyllum* (Pers.) F. Muell. (apio cimarrón), *Rumex crispus* L. (lengua de vaca), *Rumex conglomeratus* Murr. (lengua de vaca), *Rumex pulcher* L. (lengua de vaca), *Coleostephus myconis* (L.) Cass. (margarita de Piria).

Las especies *Anthemis cotula* L. (manzanilla) y *Plantago lanceolata* L. (llantén grande) se obtuvieron de descartes de maquinación debido a la imposibilidad de realizar su colecta en el campo.

3.1.1.2. Trilla

Luego de cosechadas las semillas de malezas se colocaron en cámara de secado durante 15 días aproximadamente a 26°C y 12% Hr (humedad relativa) con el objetivo de acelerar el proceso de secado para facilitar su trilla y evitar el deterioro de las semillas.

La trilla se realizó mecánicamente con una trilladora, modelo Almaco (anexo 2), con el objetivo de simular la fricción y el daño producido por una cosechadora, obteniendo así semillas que tuvieron tratamiento similar que las que se encuentran como contaminantes en lotes comerciales de semilla. La velocidad del cilindro fue regulada en función del tipo de material vegetal y tipo de semilla a trillar para evitar daños mayores en las mismas. Las revoluciones por minuto (r.p.m) variaron desde 1300 a 2200.



Malezas prohibidas: 1-*Sorghum halepense* (sorgo de alepo); 2-*Cuscuta* spp.; **Malezas objetables:** 3-*Coleostephus myconis* (margarita de Piria); 4-*Plantago lanceolata* (llantén grande); 5-*Carduus acanthoides* (cardo chileno); 6-*Cirsium vulgare* (cardo negro); 7-*Centaurea calcitrapa* (abrepuño)); 8-*Rumex pulcher* (lengua de vaca); 9-*Rumex crispus* (lengua de vaca); 10-*Echium plantagineum* (flor morada); 11-*Silene gallica* (calabacilla); 12-*Rumex conglomeratus*; 13-*Ammi viznaga* (vznaga); 14-*Plantago myosurus* (llantén chico); 15-*Ammi majus* (falsa viznaga); 16-*Apium leptophyllum* (apio cimarrón); 17- *Anthemis cotula* (manzanilla); **Cultivos:** 18-*Trifolium repens* (trebol blanco); 19- *Trifolium pratense* (trebol rojo); 20- *Trifolium alexandrinum* (trebol alejandrino); 21-*Medicago sativa* (alfalfa); 22-*Lotus corniculatus* (lotus).

Figura 6. Foto de semillas de diferentes malezas objetables, prohibidas y cultivos forrajeros de leguminosas

3.1.1.3. Limpieza

El procesamiento o maquinación de las semillas de malezas con el objetivo de maximizar su pureza física se realizó en el laboratorio de la sección de semillas de INIA La Estanzuela. Las diferentes maquinas de procesamiento (de escala experimental) que se utilizaron principalmente fueron: clasificadora de aire y zarandas modelo Clipper (Michigan, USA); mesa densimétrica; tabla vibradora; plano inclinado; rodillos afelpados; cilindros alveolados modelo LA-T Westrup (Dinamarca); clasificadora de aire modelo 757 (Dakota, USA), se pueden ver en anexo 2.

La secuencia de limpieza luego de la trilla, se ajustó de acuerdo a las diferentes propiedades físicas de las semillas de malezas y a la naturaleza de las impurezas. Las características físicas usadas en la secuencia de maquinado fueron: tamaño (ancho, largo y profundidad), peso, densidad, textura y capacidad para rodar. El procesamiento de las semillas para cada especie de maleza se resume en anexo 3.

Al final de cada maquinación se realizó una limpieza manual. Para la misma se utilizó el diafanoscopio, espátula y lupa para poder asegurar el 99.9% de pureza física, finalizando así el proceso de limpieza de las muestras de semillas de malezas.

3.1.2. Semillas de cultivos de leguminosas forrajeras

Los cultivos de especies de leguminosas forrajeras usadas fueron: *Trifolium repens* L. cv. Zapican (trébol blanco); *Trifolium pratense* L. cv. E 116 (trébol rojo); *Trifolium alexandrinum* Bory & Chaubar cv. Calipso (trébol alejandrino); *Lotus corniculatus* L. (lotus) mezcla cv. San Gabriel y cv. Inia Draco y *Medicago sativa* L. (alfalfa) mezcla cv. Chana y Crioula. Los mismos se obtuvieron de lotes de semilla Fundación procedentes de la Estación Experimental La Estanzuela y el único proceso de limpieza que se les realizó fue por espátula en el diafanoscopio y en algunos casos bajo lupa para poder asegurar 99.9% de pureza física.

3.1.3. Instrumento NIRS

Para el análisis de semillas se utilizó el instrumento NIRS 6500 (NIRSystem monochromator, Silver Spring, MD, USA). Este modelo (Fig. 7) permite irradiar las muestras en el rango de 400 a 2500nm, es decir desde el espectro visible (VIS) hasta el final del infrarrojo cercano (NIR).



Figura 7. Instrumento NIRS

3.1.4. Metodología de análisis

Una vez finalizada la etapa de campo, trilla y procesamiento de las semillas, se procedió a preparar las muestras a usar en el NIRS

Se utilizaron 5 gramos de semillas de cada una de las especies con 4 repeticiones, a excepción de *Anthemis cotula* se utilizaron 2 repeticiones. En total se utilizaron 78 muestras que fueron colocadas, de a una, en el instrumento NIRS en una cubeta circular de 8cm³ y escaneadas desde 400 a 2500nm de longitud de onda.

El NIRS crea una base de datos de reflectancia en la que cada especie esta identificada con un numero que le asignamos previamente. Los datos de reflectancia se almacenaron como el logaritmo 1/R (R = reflectancia) a 2nm de intervalo (1050 datos por repetición).

Los espectros obtenidos por reflectancia fueron analizados con el programa WinISI versión 1.5 (Infrasoft International, LLC).

Con todos los datos de reflectancia (81.900 en total) para las 78 muestras de semillas y el número de referencia para cada especie se desarrolla una ecuación de calibración que posteriormente se valida con un set de muestras que no fueron utilizadas para desarrollar la ecuación, para esto se utilizan 20 muestras externas desconocidas por el instrumento NIRS (una para cada especie). La ecuación proporciona un número que permite la inclusión en una u otra especie dependiendo de la proximidad del dígito a uno u otro valor. En función de este valor se evalúa el potencial de identificar correctamente las semillas de cada especie. Por ejemplo, si a una especie a la cual le asignamos el número 5, y una muestra desconocida es identificada por el instrumento NIRS como 4,9, entonces entendemos como altamente probable que sea la especie número 5. Si sabemos ciertamente que la muestra desconocida para el instrumento NIRS es la número 5, estamos en presencia de una buena predicción.

Las ecuaciones de calibración y predicción se desarrollaron usando el método estadístico de regresión: cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS) (Shenk y Westerhaus, 1994). Las estadísticas de la calibración y validación externa calculadas incluyen el error estándar de la calibración (SEC), el coeficiente de determinación en la calibración (R^2C), el error estándar de la predicción (SEP) y el coeficiente de determinación en la predicción (R^2P).

3.2. EXPERIMENTO 2: DETERMINAR LA CAPACIDAD DEL NIRS DE CUANTIFICAR SEMILLAS DE MALEZAS OBJETABLES EN SEMILLAS DE TRÉBOL BLANCO

3.2.1. Semillas de malezas objetables

Las semillas de malezas objetables utilizadas para este experimento son las mismas que se utilizaron para el experimento 1 (cuadro 6) y fueron obtenidas como se explicó anteriormente

3.2.2. Semillas de trébol blanco

Se utilizó el cultivar Zapican que se obtuvo de lotes de semilla Fundación procedentes de la Estación Experimental del INIA La Estanzuela.

3.2.3. Metodología de análisis

Se prepararon muestras de 2 gramos de trébol blanco con diferentes contaminaciones (% en peso) de semillas de una misma maleza objetable (cuadro 7). Este procedimiento se repitió para las diferentes malezas objetables.

La metodología de análisis es la misma que la utilizada en el experimento 1. La diferencia es que se obtienen 15 ecuaciones de calibración y validación, una por cada maleza objetable utilizada como contaminante.

Cuadro 7. Muestras de 2 gramos de trébol blanco con diferentes contaminaciones (% en peso) de semillas de maleza objetable

% <i>T. repens</i>	99,7*	99,2	98,7	97,7	94,7	89,7
% maleza objetable	0	0.5	1	2	5	10

* el restante 0,03% corresponde a materia inerte, principalmente restos vegetales y tierra que no se pudieron extraer.

Para desarrollar la ecuación de calibración (una por maleza) se utilizaron 4 repeticiones por cada contaminación. También se valida la ecuación con un set de muestras externas, para esto se utilizan 6 muestras (una para cada contaminación).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. RESULTADOS EXPERIMENTO 1

De las diferentes muestras analizadas de semillas de malezas objetables y semillas de cultivos de leguminosas forrajeras, se obtuvieron espectros en el rango del espectro visible (VIS) e infrarrojo cercano (NIR) como muestra la figura 8.

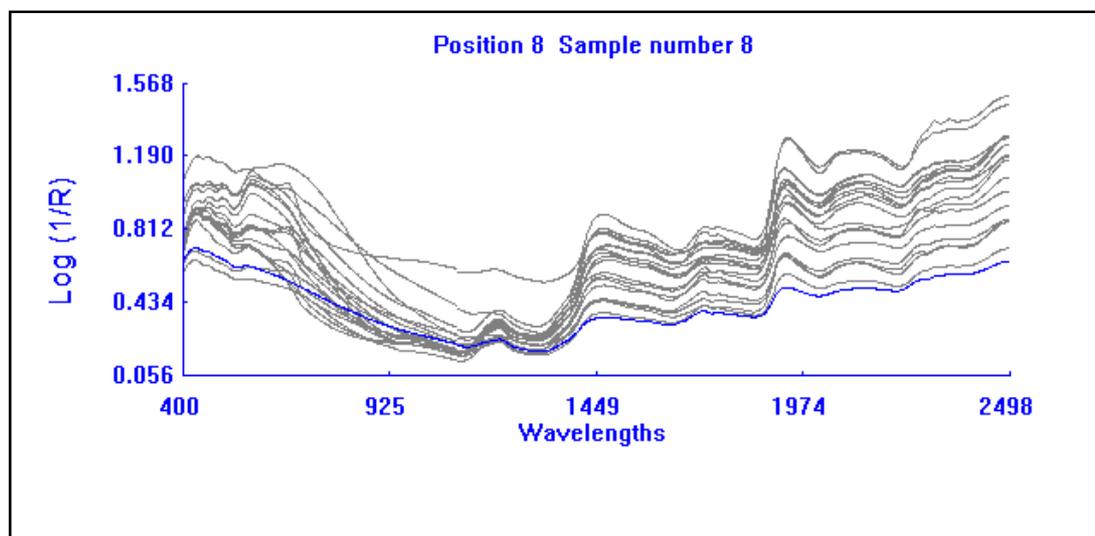


Figura 8. Espectros de las muestras analizadas para la identificación de semillas.

En función a dicha información espectral (valores de $\log 1/R$) y el método de referencia utilizado (asignación de un número diferente para cada especie) es que se desarrolla una ecuación de calibración para la identificación de semillas.

Los resultados de dicha ecuación se resumen en el siguiente cuadro 8.

Cuadro 8. Resultados de la ecuación de calibración para todas las especies.

Nc	P	SD	SEC	R ² C
78	10,25	5,66	0,21	0,99

Nc: numero de muestras

P: promedio de los valores de referencia

SD: desvío estándar.

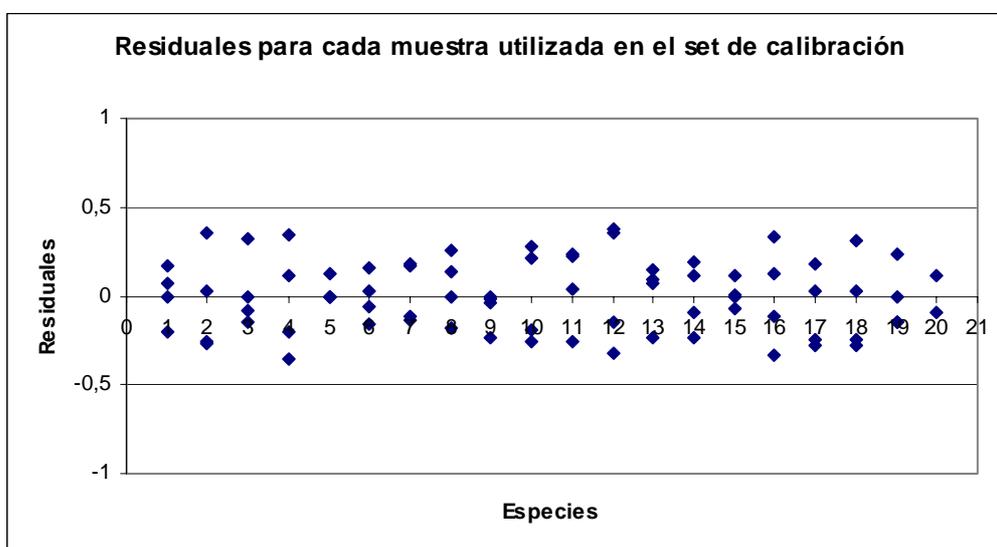
SEC: error estándar de calibración

R²C: coeficiente de determinación de calibración;

Los valores de promedio y desvío son referentes al conjunto de datos de los valores asignados para cada especie (de 1 a 20).

La ecuación se considera confiable por presentar bajo error estándar de calibración (SEC: 0.21) y elevado coeficiente de determinación (R^2 : 0.99).

En la siguiente figura 9 se muestran los residuales (valor de predicción menos valor de referencia) obtenidos para cada muestra de las diferentes especies que integran la ecuación de calibración. Los valores se pueden observar en anexo 4.



1-*Trifolium repens*; 2-*Medicago sativa*; 3-*Trifolium alexandrinum*; 4-*Lotus corniculatus*; 5-*Trifolium pratense*; 6-*Rumex conglomeratus*; 7-*Silene gallica*; 8-*Carduus acanthoides*; 9-*Rumex crispus*; 10-*Echium plantagineum*; 11-*Rumex pulcher*; 12-*Cirsium vulgare*; 13-*Ammi majus*; 14-*Coleostephus myconis*; 15-*Plantago myosurus*; 16-*Apium leptophyllum*; 17-*Centaurea calcitrapa*; 18-*Ammi viznaga*; 19-*Plantago lanceolata*; 20-*Anthemis cotula*.

Figura 9. Residuales para cada muestra utilizada en el set de calibración.

En la figura 9 se observa que el valor residual para todas las muestras que integran la ecuación es menor a 0,5; resultando en una buena correlación entre los datos espectrales y los de referencia. Esto se interpreta por ejemplo que la muestra identificada con el número 11 (*Rumex pulcher*) tuvo un máximo de predicción de 11.23 y un mínimo de 10.74 permitiendo al igual que en las otras muestras una diferencia menor a 0.5 y por eso su correcta identificación.

La ecuación se somete a una prueba, con un set de muestras independiente de validación, que no formaron parte del grupo de calibración, con el objetivo de evaluar su poder de predicción.

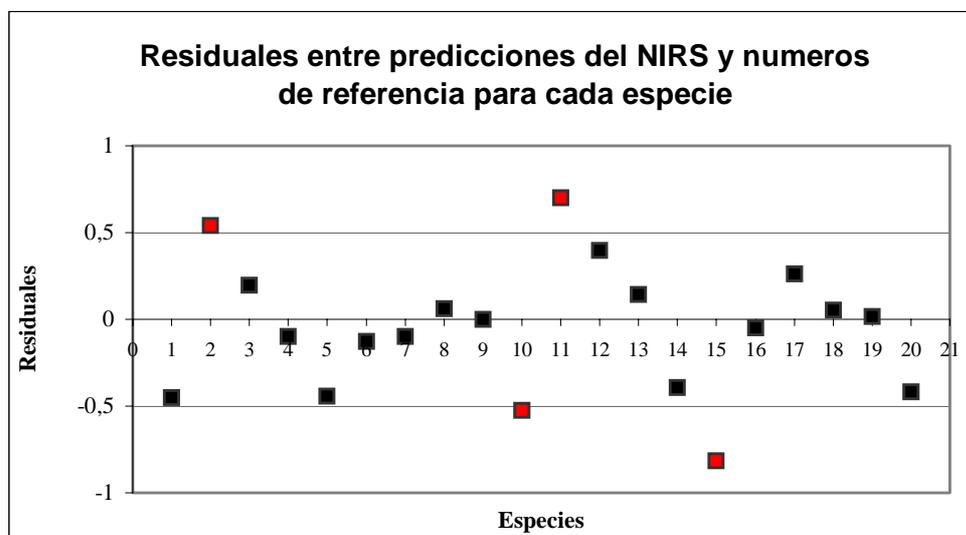
Los resultados de la validación externa son presentados en el siguiente cuadro 9.

Cuadro 9. Resultados de la validación externa.

Nv:	20
SEP:	0,37
R²P:	0,996

Nv: número de muestras externas para validar la ecuación;
SEP: error estándar de predicción;
R²P: coeficiente de determinación para la predicción

La siguiente figura 10 ilustra los resultados obtenidos en la validación de la ecuación para las 20 muestras que no integraron el set de calibración para el instrumento NIRS. Los valores de predicción se pueden observar en anexo 5.



1-*Trifolium repens*; 2-*Medicago sativa*; 3-*Trifolium alexandrinum*; 4-*Lotus corniculatus*; 5-*Trifolium pratense*; 6-*Rumex conglomeratus*; 7-*Silene gallica*; 8-*Carduus acanthoides*; 9-*Rumex crispus*; 10-*Echium plantagineum*; 11-*Rumex pulcher*; 12-*Cirsium vulgare*; 13-*Ammi majus*; 14-*Coleostephus myconis*; 15-*Plantago myosurus*; 16-*Apium leptophyllum*; 17-*Centaurea calcitrapa*; 18-*Ammi viznaga*; 19-*Plantago lanceolata*; 20-*Anthemis cotula*.

Figura 10. Residuales entre predicciones del NIRS y números de referencia para cada especie.

Los puntos en rojo que se observan en la figura 10 son las muestras externas con valor residual mayor a 0.5, no permitiendo su correcta identificación. Es decir que de las 20 muestras externas desconocidas para el NIRS solo 4 no fueron identificadas correctamente. En este caso los resultados muestran que las muestras externas de *Medicago sativa*; *Echium plantagineum*; *Rumex pulcher* y *Plantago myosurus* tienen un valor dado por la ecuación de predicción que no permite su identificación. Por ejemplo la ecuación de predicción arroja un valor de 11.7 para la muestra de *Rumex pulcher* estando esta identificada con el número 11 y arroja un valor de 14.18 para la muestra externa de *Plantago myosurus* la que esta identificada con el número 15.

Si bien en los análisis de semillas se trata de llegar a la identificación de las semillas de la especie malezas, muchas veces es imposible por no haber diferencias morfológicas entre una y otra especie a nivel de semillas. También es muy difícil la identificación de semillas parecidas y mas aún cuando han perdido caracteres relevantes durante el proceso de limpieza (procesamiento o maquinación). En estos casos las semillas son identificadas solamente por su género. Son ejemplo de estas últimas las especies del género *Rumex* como *R. conglomeratus*, *R. pulcher*, *R. crispus* y las especies del género *Ammi* como *A. viznaga* y *A. majus*.

Los resultados demuestran que *Ammi majus* y *Ammi viznaga* especies muy similares a nivel de semillas son diferenciadas por el NIRS al igual que *Rumex crispus* y *Rumex conglomeratus*.

Es importante destacar que la ecuación desarrollada es de validez para estos datos o muestras en particular, pero probablemente se comporte pobremente al probarla con un set de muestras de validación de una población abierta, debido a la mayor variabilidad natural. Esto mismo es manifestado por Murray en 1993 (Alomar, 1998).

4.2. RESULTADOS EXPERIMENTO 2

Se obtuvieron 15 ecuaciones de calibración, una por cada maleza utilizada en diferentes concentraciones (% en peso) como contaminante único en muestras de trébol blanco. Para cada ecuación de calibración se utilizó un set extra con el objetivo de validar dichas ecuaciones.

Los resultados para cada ecuación de calibración y su validación externa se resumen en el siguiente cuadro 10.

Cuadro 10. Resultado de las 15 ecuaciones de calibración y validación externa desarrolladas con las muestras de trébol blanco + semillas de malezas objetables

Trébol blanco + Maleza objetable	Ecuación de Calibración					Validación Externa		
	Nc	Prom.	SD	SEC	R ² C	Nv	SEP	R ² P
<i>Trifolium repens</i> + <i>Echium plantagineum</i>	24	96,61	3,56	0,17	0,99	6	3,44	0,92
<i>Trifolium repens</i> + <i>Ammi majus</i>	24	96,61	3,56	0,22	0,99	6	2,35	0,73
<i>Trifolium repens</i> + <i>Plantago myosurus</i>	24	96,61	3,56	0,23	0,99	6	1,3	0,86
<i>Trifolium repens</i> + <i>Coleostephus myconis</i>	24	96,61	3,56	0,23	0,99	6	0,95	0,97
<i>Trifolium repens</i> + <i>Apium leptophyllum</i>	24	96,61	3,56	0,39	0,98	6	1,42	0,92
<i>Trifolium repens</i> + <i>Ammi viznaga</i>	24	96,61	3,56	0,4	0,98	6	1,94	0,82
<i>Trifolium repens</i> + <i>Plantago lanceolata</i>	24	96,61	3,56	0,47	0,98	6	1,19	0,88
<i>Trifolium repens</i> + <i>Silene gallica</i>	24	96,61	3,56	0,47	0,98	6	1,16	0,97
<i>Trifolium repens</i> + <i>Carduus acanthoides</i>	24	96,61	3,56	0,58	0,97	6	2,25	0,7
<i>Trifolium repens</i> + <i>Centaurea calcitrapa</i>	24	96,61	3,56	0,87	0,94	6	1,74	0,76
<i>Trifolium repens</i> + <i>Anthemis cotula</i>	24	96,61	3,56	0,89	0,93	6	0,84	0,95
<i>Trifolium repens</i> + <i>Rumex crispus</i>	24	96,61	3,56	0,94	0,93	6	1,9	0,79
<i>Trifolium repens</i> + <i>Rumex conglomeratus</i>	24	96,61	3,56	0,97	0,92	6	1,28	0,92
<i>Trifolium repens</i> + <i>Cirsium vulgare</i>	24	96,61	3,56	1,21	0,88	6	2,35	0,7
<i>Trifolium repens</i> + <i>Rumex pulcher</i>	24	96,61	3,56	1,56	0,8	6	1,41	0,84

Nc: numero de muestras utilizadas para crear la ecuación de calibración; **Prom.:** promedio % pureza; **SD:** desvío estándar % pureza; **SEC:** error estándar de calibración, **R²C:** coeficiente de determinación múltiple para la ecuación de calibración; **Nv:** número de muestras externas para validar la ecuación; **SEP:** error estándar de predicción; **R²P:** coeficiente de determinación para la predicción.

Las ecuaciones que presentan mejores resultados son las que presentan menor SEC y mayor R²C, que no significa que su predicción frente a muestras externas sea satisfactoria. Por ejemplo la ecuación de calibración para *Trifolium repens* + *Echium plantagineum* muestra los mejores resultados (SEC: 0,17 y R²C: 0,99), sin embargo el poder de predicción de dicha ecuación (SEP: 3,44 y R²P: 0,92) no permite identificar correctamente las muestras externas (Fig. 11).

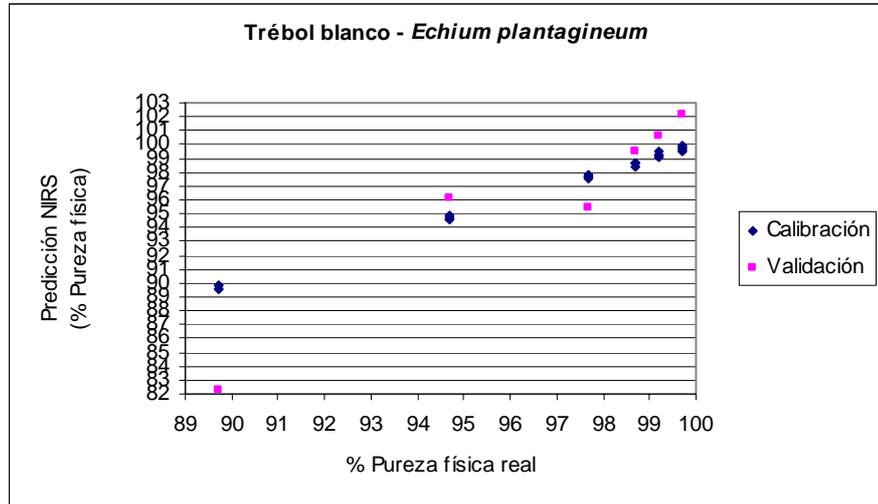


Figura 11. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con *Echium plantagineum* (Flor morada) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 6).

A continuación se representan en forma de gráfica (Fig. 12, 13 - 25) los resultados de las ecuaciones de calibración y validación externa, una por cada maleza objetable utilizada como contaminante. Las gráficas se presentan en orden, de menor a mayor SEC.

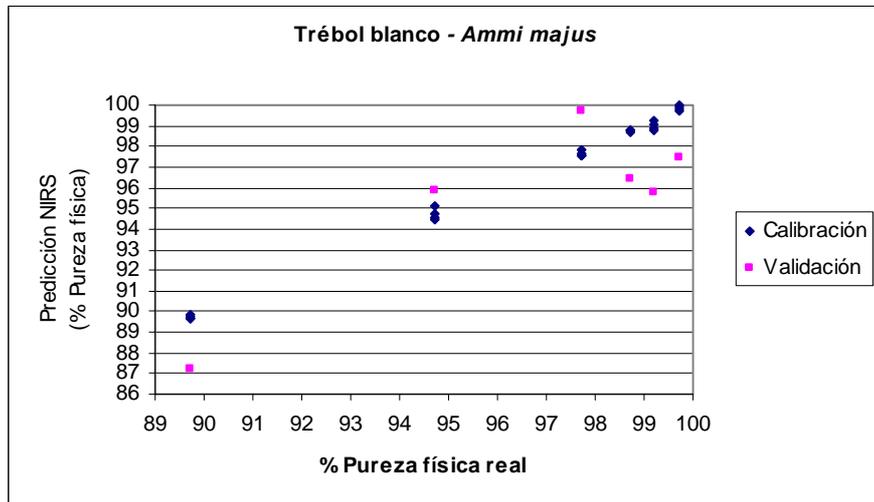


Figura 12. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con *Ammi majus* (falsa viznaga) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 7).

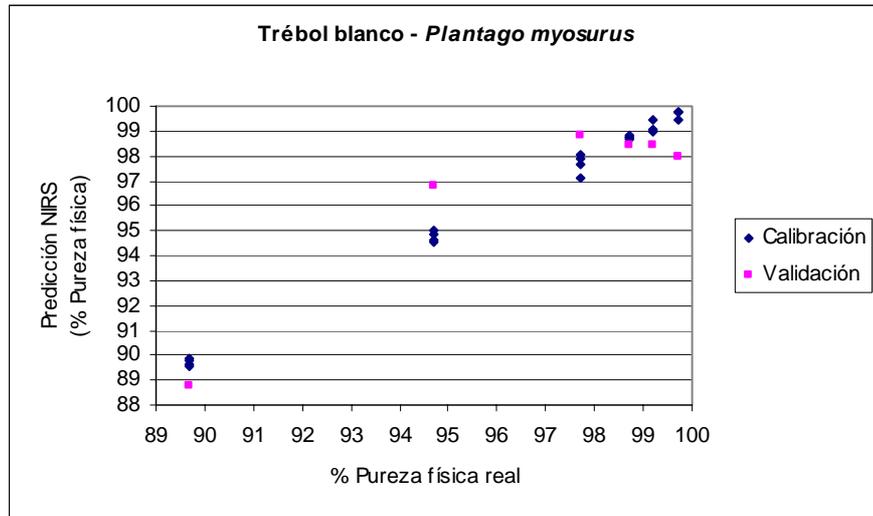


Figura 13. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con *Plantago myosurus* (llantén chico) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 8).

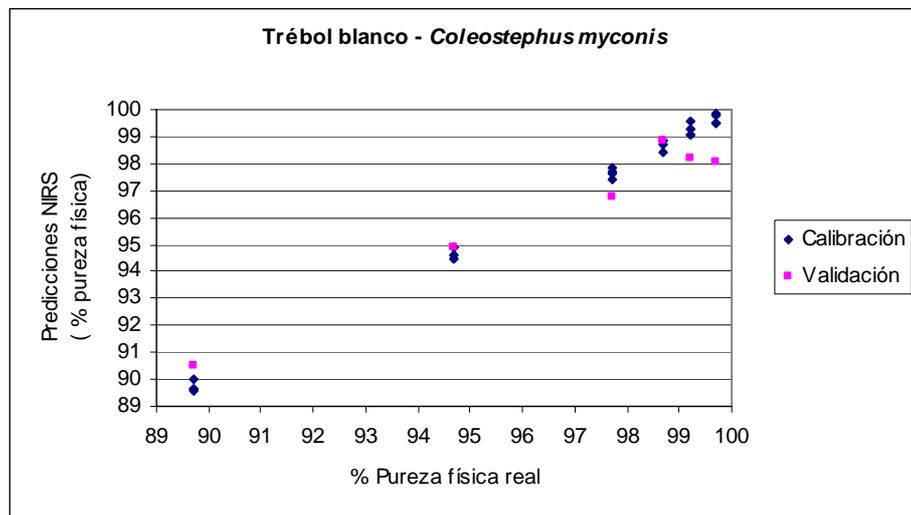


Figura 14. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con *Coleostephus myconis* (margarita de Piria) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 9).

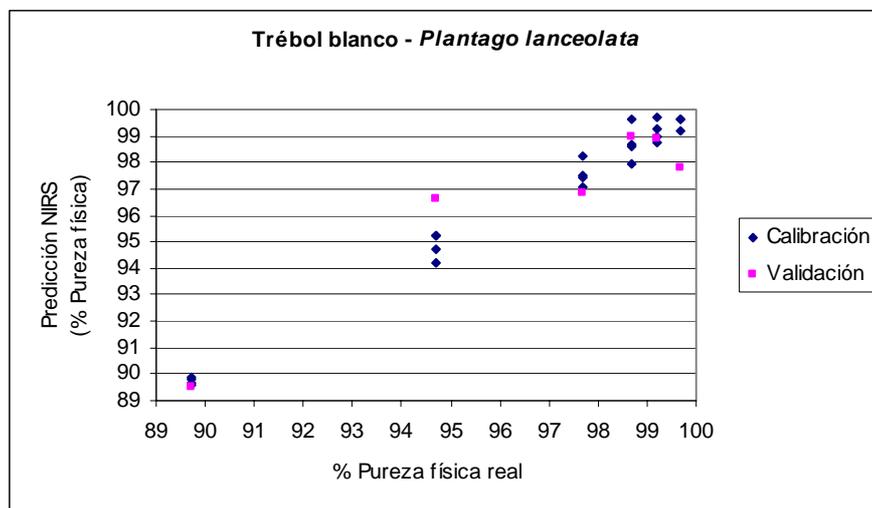


Figura 17. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con *Plantago lanceolata* (llantén grande) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 12).

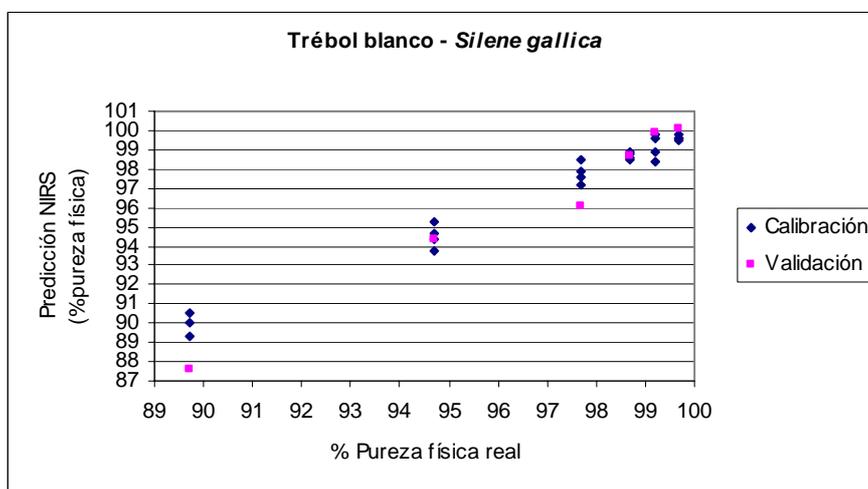


Figura 18. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con *Silene gallica* (calabacilla) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 13).

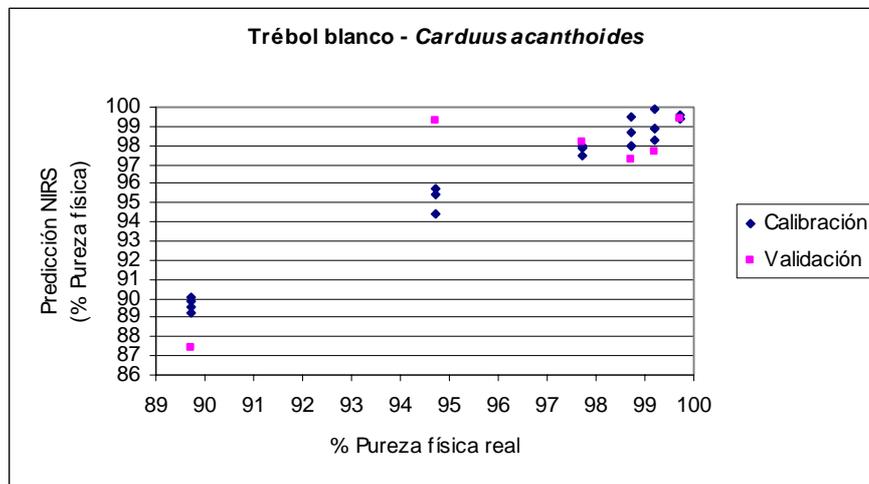


Figura 19. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con *Carduus acanthoides* (cardo chileno) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 14).

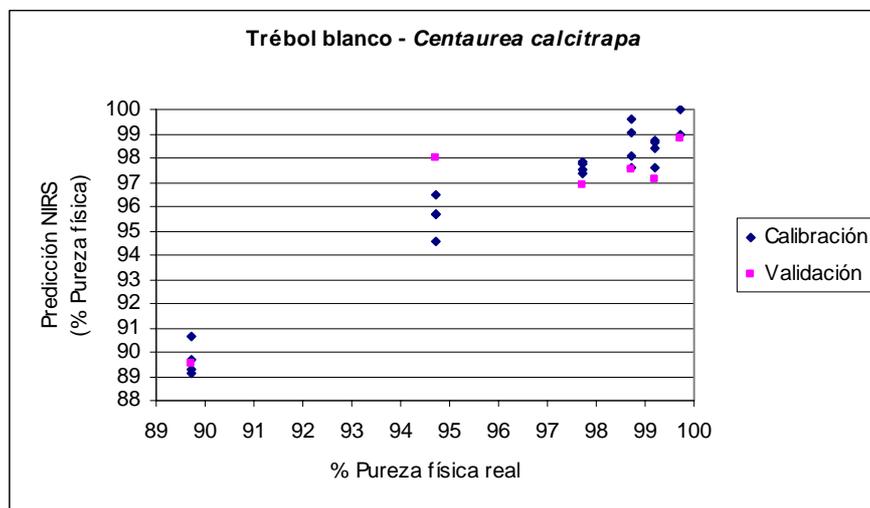


Figura 20. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con *Centaurea calcitrapa* (abrepuño) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 15).

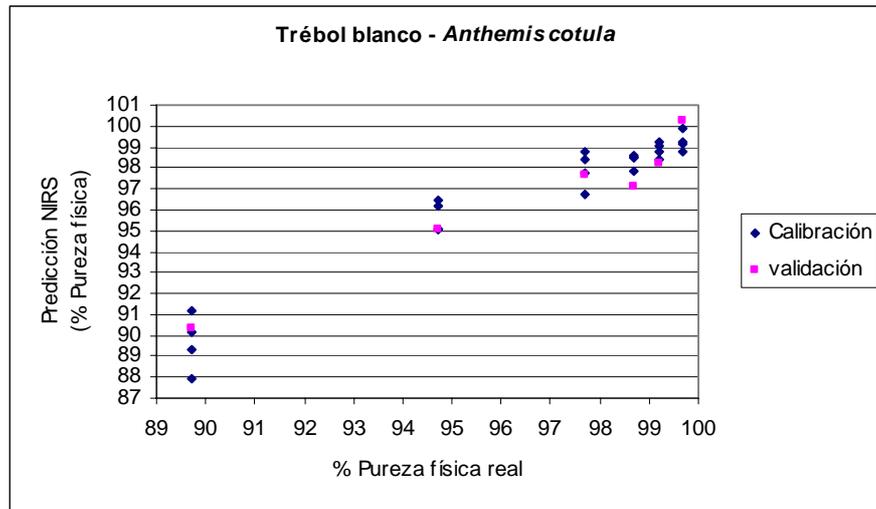


Figura 21. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con *Anthemis cotula* (manzanilla) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 16).

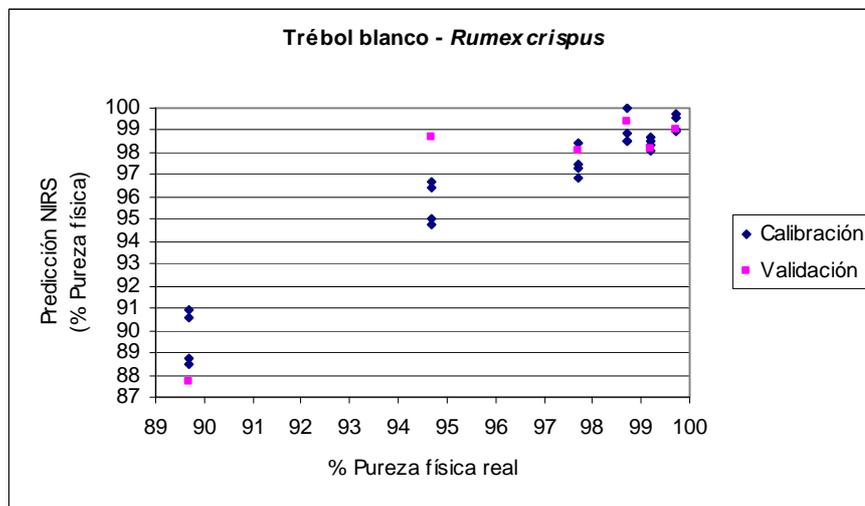


Figura 22. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con *Rumex crispus* (lengua de vaca) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 17).

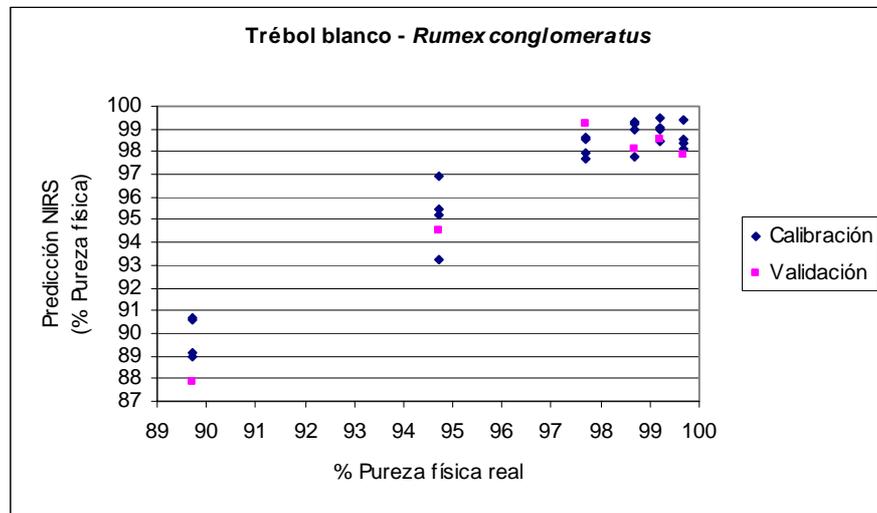


Figura 23. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con *Rumex conglomeratus* como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 18).

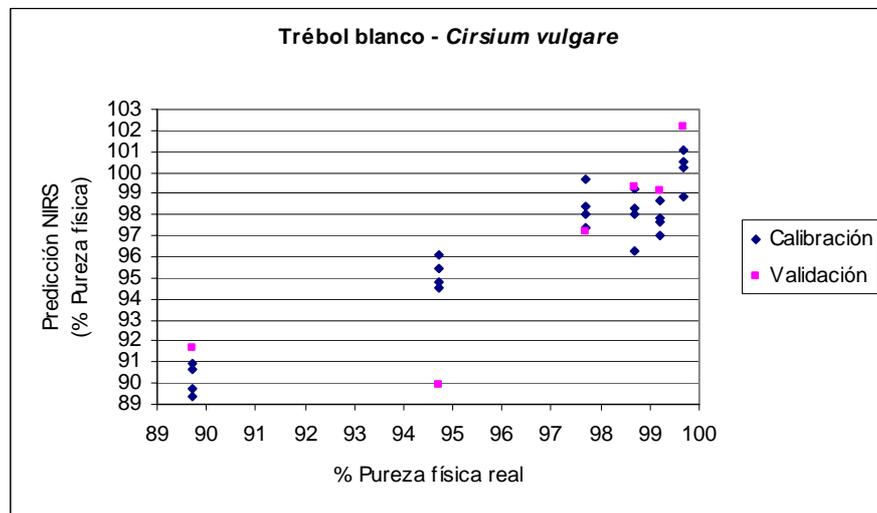


Figura 24. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con *Cirsium vulgare* (cardo negro) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 19).

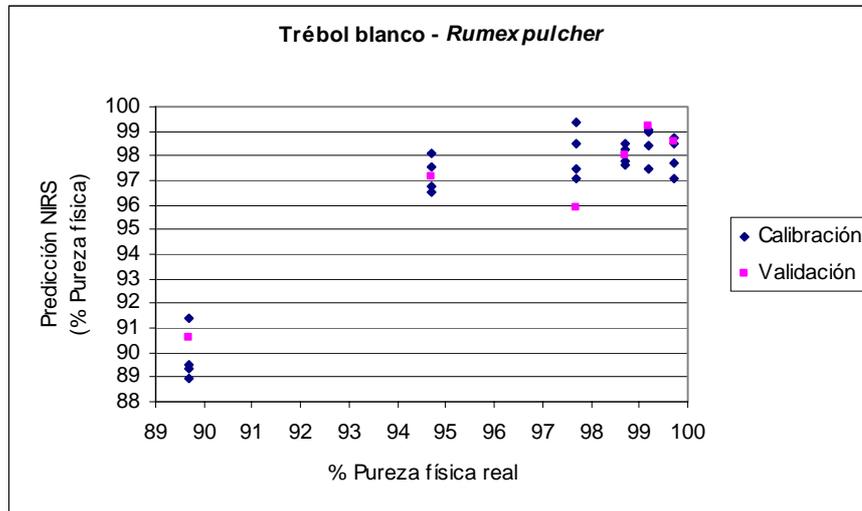


Figura 25. Representación gráfica de la ecuación de calibración y validación para trébol blanco con *Rumex pulcher* (lengua de vaca) como único contaminante a diferentes concentraciones (datos originales en anexo 20).

La ecuación de calibración que presenta los peores resultados es la desarrollada para *Trifolium repens* + *Rumex pulcher* con valores de SEC: 1,56 y R^2C : 0,80. (Figura 25).

Se destacan como buenos los resultados obtenidos en las ecuaciones de calibración y validación para *Anthemis cotula* (SEC: 0,89; R^2C : 0,93 y SEP: 0,84); *Coleostephus myconis* (SEC: 0,23; R^2C : 0,99 y SEP: 0,95); y *Silene gallica* (SEC: 0,47; R^2C : 0,98 y SEP: 1,16).

En resumen hubo una notoria diferencia en la habilidad del NIRS en identificar las diferentes semillas de malezas objetables usadas como contaminantes a diferentes concentraciones en trébol blanco. Se observa en general que el NIRS es capaz de diferenciar distintas purzas permitiendo diferenciar altas (99,7%) de bajas (89,7%) y presenta mayores dificultades en diferenciar purzas parecidas (99,7%; 99,2%; 98,7%; 97,7%).

5. CONCLUSIONES

Experimento 1.

- La técnica NIRS es capaz de identificar correctamente las semillas de los cultivos forrajeros de leguminosas: *Trifolium repens* (trébol blanco); *Trifolium pratense* (trébol rojo); *Lotus corniculatus* (lotus); *Trifolium alexandrinum* (trébol alejandrino) y las semillas de malezas objetables: *Ammi visnaga* (viznaga), *Ammi majus* (falsa viznaga), *Cirsium vulgare* (cardo negro), *Carduus acanthoides* (cardo chileno) *Centaurea calcitrapa* (abrepuños), *Silene gallica* (calabacilla), *Apium leptophyllum* (apio cimarrón), *Rumex crispus* (lengua de vaca), *Rumex conglomeratus*, *Coleostephus myconis* (margarita de Piria); *Anthemis cotula* (manzanilla) y *Plantago lanceolata* (llantén grande).
- No se logra identificar correctamente a las semillas de: *Medicago sativa* (alfalfa) y a las semillas de las malezas objetables: *Echium plantagineum* (flor morada); *Rumex pulcher* (lengua de vaca) y *Plantago myosurus* (llantén chico).
- Semillas de distintas malezas objetables muy parecidas entre ellas, como es el caso de *Ammi majus* con *Ammi visnaga* y *Rumex pulcher* con *Rumex conglomeratus* lograron correctamente identificarse por la técnica NIRS.

Experimento 2.

- La técnica NIRS es capaz de cuantificar diferentes niveles de pureza física de muestras de semillas de trébol blanco contaminadas con semillas de malezas objetables. Las 15 ecuaciones de calibración desarrolladas, en general permiten diferenciar purezas físicas altas de purezas físicas bajas.
- Se logra una mejor predicción del porcentaje de pureza física de trébol blanco cuando se utiliza como contaminante las semillas de las malezas *Anthemis cotula*; *Coleostephus myconis* o *Silene gallica*.

El presente trabajo demuestra el potencial de la tecnología NIRS en la identificación de semillas y sus contaminantes. Genera antecedentes de uso del NIRS como identificador de semillas y abre nuevas puertas para trabajos futuros (ej: identificación de semillas de especies muy similares como *Lotus subbiflorus* y *Lotus pedunculatus*, etc).

6. RESUMEN

Las semillas de malezas objetables de los principales cultivos de leguminosas forrajeras en Uruguay se caracterizan por ser difíciles de separar en el proceso de limpieza de lotes de semillas. Su identificación y cuantificación es de carácter relevante para asegurar la calidad del lote de semillas. El objetivo de este trabajo es analizar las posibilidades de utilizar la tecnología NIRS (Reflectancia en el Infrarrojo Cercano) en el análisis de semillas. Para esto se plantearon dos experimentos:

Experimento 1: Determinar la capacidad del NIRS para reconocer a nivel de especie las diferentes semillas de leguminosas forrajeras y malezas objetables.

Experimento 2: Determinar la capacidad del NIRS de cuantificar semillas de malezas objetables en semillas de trébol blanco.

En el experimento 1, se utilizaron semillas de 5 especies de leguminosas forrajeras (*Medicago sativa*, *Lotus corniculatus*, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense* y *Trifolium alexandrinum*) que se obtuvieron de lotes de semilla Fundación procedentes de la Estación Experimental La Estanzuela y semillas de 15 especies de malezas objetables (*Ammi visnaga*, *Ammi majus*, *Anthemis cotula*, *Apium leptophyllum*, *Carduus acanthoides*, *Centaurea calcitrapa*, *Cirsium vulgare*, *Coleostephus myconis*, *Echium plantagineum*, *Plantago lanceolata*, *Plantago myosurus*, *Rumex crispus*, *Rumex conglomeratus*, *Rumex pulcher* y *Silene gallica*.) que se colectaron en el campo, se trillaron, maquinaron y purificaron bajo lupa para asegurar 99,9% de pureza física.

Las muestras de semillas de las diferentes especies se analizaron con el instrumento NIRS 6500 (NIRSystem, Silver Spring, MD, USA). Se utilizaron muestras de 5 gramos de semillas de cada una de las especies con 4 repeticiones, a excepción de *Anthemis cotula* que se utilizaron 2 repeticiones. Con todos los datos de reflectancia para las muestras de semillas y el número de referencia para cada especie se desarrolló una ecuación de calibración que posteriormente se validó con un set de 20 muestras externas desconocidas por el instrumento NIRS (una para cada especie).

En el experimento 2, se prepararon muestras de 2 gramos de *Trifolium repens* con diferentes contaminaciones (% en peso) de semillas de una misma maleza objetable. Este procedimiento se repitió para las diferentes malezas objetables.

La metodología de análisis es la misma que la utilizada en el experimento 1. La diferencia es que se obtienen 15 ecuaciones de calibración y validación, una por cada maleza objetable utilizada como contaminante.

Para desarrollar la ecuación de calibración (una por maleza) se utilizaron 4 repeticiones por cada contaminación. También se valida la ecuación con un set de muestras externas, para esto se utilizan 6 muestras (una para cada contaminación).

Los resultados para el experimento 1 indican que el NIRS es capaz de identificar correctamente las semillas de leguminosas forrajeras a excepción de *Medicago sativa* e identificar correctamente las semillas de malezas objetables a excepción de *Echium plantagineum*, *Rumex pulcher* y *Plantago myosurus*.

Los resultados para el experimento 2 indican que hubo una notoria diferencia en la habilidad del NIRS en identificar las diferentes semillas de malezas objetables usadas como contaminantes a diferentes concentraciones en trébol blanco. Se observa en general que el NIRS es capaz de diferenciar distintas purezas permitiendo diferenciar altas de bajas y presenta mayores dificultades en diferenciar purezas parecidas. Se logra una mejor predicción del porcentaje de pureza física de trébol blanco cuando se utilizan como contaminante las semillas de las malezas *Anthemis cotula*; *Coleostephus myconis* y *Silene gallica*.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ALOMAR, D; FUCHSLOCHER, R.1998. Fundamentos de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. *Agrosur* 26(1): 88-104.
2. BAKER, J. E; DOWELL, F. E; THRONE, J. E. 1999. Detection of parasitized rice weevils in wheat kernels with near-infrared spectroscopy. *Biological Control* 16: 88-90.
3. CARAMBULA, M. 1981. Producción de semillas de plantas forrajeras. Montevideo. Ed. Hemisferio Sur. 518 p.
4. CAVELIER, M; BOLLEN, L; DARDENNE, P. 1995. Application de la spectrometrie dans le proche infrarouge a la determination des taux d'infection des grains de froment par *Septoria nodorum* Berk. 47th International symposium on crop protection, Gent, Belgium,9 May, 1995. *Mededelingen-Faculteit-Landbouwkundige-en-Toegepaste-Biologische-Wetenschappen,-Universiteit-Gent*. 1995, 60: 2b, 459-467; 11 ref. in CAB Abstract 1996-1998/07.
5. COZZOLINO, D. 1998 a. Aplicación de la técnica NIRS para la determinación de calidad en productos agrícolas. INIA. Serie Técnica N° 97. 10 p.
6. _____. 1998 b. Visible and Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) for the assessment of flesh foods. Thesis PhD. Aberdeen, Scotland. United Kingdom. University of Aberdeen. p. 39-46.
7. _____.; ACOSTA, Y; GARCIA, J. 2001. Application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage evaluation in Uruguay In *Proceedings of the XIX International Grassland Congress*. p. 371.
8. _____. 2002. Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. *Agrociencia* 6(2): 25-32.
9. DECRETO REGLAMENTARIO N° 438/004. Instituto Nacional de Semillas (INASE). <http://www.inase.org.uy>
10. DEL PUERTO, O. 1975. Identificación de semillas de malezas. *Compuestas*. Montevideo. Facultad de Agronomía. Bol. N°128. 78 p.

11. _____. 1979. Algunas malezas que aparecen como impurezas en semillas de forrajeras. Revista del Plan Agropecuario. Trabajos técnicos II, p. 8-16.
12. _____. 1984. Identificación de semillas de malezas (III) Crucíferas, Geraniaceas, Plantaginaceas, Poligonaceas. Montevideo. Facultad de Agronomía. Bol. N°133. 62 p.
13. DOWNEY, G. 1996 a. Authentication of food and food ingredients by Near Infrared Spectroscopy: a review. Journal of Near Infrared Spectroscopy. 4: 47-61
14. _____. 1996 b. Qualitative analysis in the near infrared region. Analyst. 119: 2369-2375
15. HOWARD, M. 2001. Near Infrared Instrumentation. In Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. Ed. by P. Williams and K. Norris. Minnesota, AACC. p. 233.
16. HUGO, W; COZZOLINO, D. 2000. Evaluación del potencial de la reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para la determinación de contaminación con cuscuta (*Cuscuta spp.*) en semillas de leguminosas. In Seminario panamericano de semillas, (17, 2000, Conrad Resort y Casino Punta del Este, Uruguay). Resúmenes de trabajos presentados, p.139.
17. ISTA, 2003. Reglas internacionales para ensayos de semilla.
18. LESTANDER, T. A; ODÉN, P.C. 2002. Separation of viable and non-viable filled Scots pine seeds by differentiating between drying rates using single seed near infrared transmittance spectroscopy. Seed science and technology 30: 383-392.
19. LEY N°16811. Instituto Nacional de Semillas (INASE). <http://www.inase.org.uy>
20. MARZOCCA, A. 1976. Manual de malezas. Actualizado por Del Puerto, O; Marsico, J.O. 3ª ed., Buenos Aires, Ed. Hemisferio Sur, SRL. 564 p.
21. McCLURE, W. F. 2001. Near Infrared Instrumentation. In Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. Ed. by P. Williams and K. Norris. Minnesota, AACC. p. 109.
22. MIN, TAI-GI; KANG, WOO-SIK. 2004. Nondestructive classification of viable and nonviable radish (*Raphanus sativus* L.) seeds using single seed near infrared spectroscopy. In ISTA Congress Seed Symposium (27th, 2004, Budapest). Abstracts p. 36.

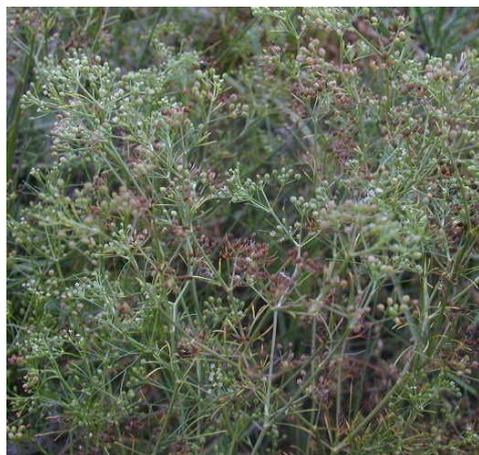
23. MORÓN, A; COZZOLINO, D. 2001. Application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for macronutrients analysis in alfalfa (*Medicago sativa* L.) In Proceedings of the XIX International Grassland Congress. p.183.
24. PAULSEN, M.R; Eckhoff, S. R; OBALDO, L; JONES, E; EUSTACE, D; YE, B; LIU, J. 2002. Measurement and removal of garlic in wheat. Applied engineering in agriculture. 18(3): 313-324. in: CAB Abstract 2002/08-2002/10.
25. PIGEON, O.; DARDENNE, P.; SINNAEVE, G.; DE VOS, P. 2000. Quality control of seed treatments using near infrared spectroscopy. Agricultural Research Centre, Pesticides Research Department, Rue du Bordia, n° 11, B-5030
26. PRITSCH, O. M. 1993. Lo que debe saberse sobre los controles de calidad de las semillas finas (III). Revista del Plan Agropecuario N°63 p. 36-42
27. SHENK, J. S; WESTERHAUS, M. O. 1994. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis. In Forage quality, Evaluation, and Utilization. Ed. by G. C. Fahey. Madison, ASA. p. 406-449.
28. SMITH, B. C. 1999. The basics of infrared interpretation. In Infrared spectral interpretation: a systematic approach. Ed. by B.C.Smith. Boca Raton, CRC. p. 1-29.
29. STAGNO, J.P. 1979. El procesamiento de las semillas finas. Revista del Plan Agropecuario. Trabajos técnicos II, p. 71-73.
30. VARO, G. A; SANCHEZ, M. T; PEREZ ,M. D. 2000. Aplicación de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) al análisis de productos de origen vegetal . Alimentaria Junio. pp 57-63
31. VELASCO, L; FERNANDEZ-MARTINEZ, J; DE HARO, A. 1997. Use of near infrared reflectance spectroscopy to screen Ethiopian mustard for seed weight. Agronomy Journal. 89: 150-153.
32. WILLIAM, R. 2001. Near Infrared Instrumentation. In Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. Ed. by P. Williams and K. Norris. Minnesota, AACC. p. 39-58.

8. ANEXOS

Anexo 1. Fotos de algunas plantas de malezas objetables.



Ammi viznaga (vznaga) *Ammi majus* (falsa viznaga)



Apium leptophyllum (Apio cimarrón)



Echium plantagineum (flor morada)



Coleostephus myconis (margarita de Piria)



Plantago myosurus (llantén chico)



Plantago lanceolata (llantén grande)



Rumex crispus (lengua de vaca)



Rumex pulcher (lengua de vaca)

Anexo 2. Instrumentos utilizados en el procesamiento de semillas de malezas objetables



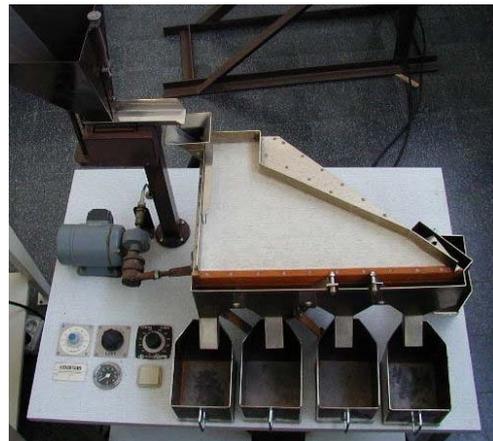
Trilladora



Clasificadora por zarandas y aire



Cilindro alveolado



Mesa densimétrica



Rodillos afelpados



Tabla vibradora

Anexo 3. Secuencia de limpieza para cada maleza

Especies de malezas	Clasificadora de aire y zarandas (tipo y numero)*	Cilindro alveolado 2mm	Cilindro alveolado 3mm	Mesa Densimetrica	Mesa vibradora	Rodillo De felpa	Viento	Espátula
<i>P. myosurus</i>	Z. de agujeros: 1x20 Z. de malla: 40x40 Z. de malla: 6x28 Z. de malla: 40x40					X	X	X
<i>P. lanceolata</i>		X						X
<i>E. plantagineum</i>	Z. de agujeros: 8 Z. de tajo: 1/20 Z. de agujeros: 7 Z. de tajo: 1/8x3/4		X					X
<i>S. gallica</i>	Z. de agujeros: 1/24 Z. de malla: 6x40			X			X	X
<i>A. leptophillum</i>	Z. de agujeros: 1/18 Z. de malla: 38x38	X						X
<i>A. majus</i>	Z. de agujeros: 1/14 Z. de malla: 6x34		X				X	X
<i>A. visnaga</i>	Z. de agujeros: 1/13						X	X
<i>R. conglomeratus</i>	Z. de agujeros: 1/16 Z. de malla: 6x24 Z. de malla: 17x17						X	X
<i>R. crispus</i>	Z. de agujeros: 1/12 Z. de malla: 4x22 Z. de tajo: 1/24x1/2 Z. de malla: 4x22	X	X				X	X
<i>R. pulcher</i>	Z. de agujeros: 1/13 Z. de malla: 4x22	X					X	X
<i>A. cotula</i>	Z. de malla: 6x28				X			X
<i>C. myconis</i>	Z. de agujeros: 1/12 Z. de malla: 6x30 Z. de malla: 6x20						X	X
<i>C. calcitrapa</i>	Z. de agujeros: 6 Z. de malla: 4x22	X			X		X	X
<i>C. vulgare</i>							X	X
<i>C. acanthoides</i>							X	X

(*) *: El número de zaranda hace referencia a la cantidad de aberturas (tajos, agujeros) por pulgada (2.54cm). Ejemplo: Z. de malla 6X30: 6 es el número de aberturas a lo largo por pulgada y 30 es el número de aberturas a lo ancho por pulgada. Se debe saber el espesor de la malla (en promedio 0.26 mm) para poder expresar la abertura en mm.

Anexo 4. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración

Especie	Número de referencia	Resultado de predicción	Residual
<i>Trifolium repens</i>	1	0,99	-0,01
<i>Trifolium repens</i>	1	1,17	0,17
<i>Trifolium repens</i>	1	1,07	0,07
<i>Trifolium repens</i>	1	0,8	-0,2
<i>Trifolium pratense</i>	5	4,99	-0,01
<i>Trifolium pratense</i>	5	5	0
<i>Trifolium pratense</i>	5	5,13	0,13
<i>Trifolium pratense</i>	5	4,99	-0,01
<i>Medicago sativa</i>	2	2,03	0,03
<i>Medicago sativa</i>	2	1,73	-0,27
<i>Medicago sativa</i>	2	2,35	0,35
<i>Medicago sativa</i>	2	1,74	-0,26
<i>Trifolium alexandrinum</i>	3	2,92	-0,08
<i>Trifolium alexandrinum</i>	3	2,99	-0,01
<i>Trifolium alexandrinum</i>	3	3,32	0,32
<i>Trifolium alexandrinum</i>	3	2,85	-0,15
<i>Lotus corniculatus</i>	4	3,64	-0,36
<i>Lotus corniculatus</i>	4	4,12	0,12
<i>Lotus corniculatus</i>	4	4,34	0,34
<i>Lotus corniculatus</i>	4	3,8	-0,2
<i>Rumex conglomeratus</i>	6	5,84	-0,16
<i>Rumex conglomeratus</i>	6	6,03	0,03
<i>Rumex conglomeratus</i>	6	5,94	-0,06
<i>Rumex conglomeratus</i>	6	6,16	0,16
<i>Silene gallica</i>	7	7,18	0,18
<i>Silene gallica</i>	7	7,17	0,17
<i>Silene gallica</i>	7	6,88	-0,12
<i>Silene gallica</i>	7	6,86	-0,14
<i>Carduus acanthoides</i>	8	8,26	0,26
<i>Carduus acanthoides</i>	8	8,14	0,14
<i>Carduus acanthoides</i>	8	8	0
<i>Carduus acanthoides</i>	8	7,82	-0,18
<i>Rumex crispus</i>	9	8,76	-0,24
<i>Rumex crispus</i>	9	8,96	-0,04
<i>Rumex crispus</i>	9	8,99	-0,01
<i>Rumex crispus</i>	9	8,98	-0,02
<i>Echium plantagineum</i>	10	9,74	-0,26
<i>Echium plantagineum</i>	10	10,28	0,28
<i>Echium plantagineum</i>	10	10,21	0,21
<i>Echium plantagineum</i>	10	9,81	-0,19

<i>Rumex pulcher</i>	11	11,23	0,23
<i>Rumex pulcher</i>	11	10,74	-0,26
<i>Rumex pulcher</i>	11	11,22	0,22
<i>Rumex pulcher</i>	11	11,04	0,04
<i>Cirsium vulgare</i>	12	12,35	0,35
<i>Cirsium vulgare</i>	12	11,68	-0,32
<i>Cirsium vulgare</i>	12	11,85	-0,15
<i>Cirsium vulgare</i>	12	12,38	0,38
<i>Ammi majus</i>	13	13,07	0,07
<i>Ammi majus</i>	13	13,15	0,15
<i>Ammi majus</i>	13	13,09	0,09
<i>Ammi majus</i>	13	12,76	-0,24
<i>Apium leptophyllum</i>	16	16,33	0,33
<i>Apium leptophyllum</i>	16	16,13	0,13
<i>Apium leptophyllum</i>	16	15,89	-0,11
<i>Apium leptophyllum</i>	16	15,67	-0,33
<i>Coleostephus myconis</i>	14	13,77	-0,23
<i>Coleostephus myconis</i>	14	14,12	0,12
<i>Coleostephus myconis</i>	14	14,19	0,19
<i>Coleostephus myconis</i>	14	13,91	-0,09
<i>Plantago myosurus</i>	15	15,11	0,11
<i>Plantago myosurus</i>	15	14,93	-0,07
<i>Plantago myosurus</i>	15	15,01	0,01
<i>Plantago myosurus</i>	15	14,99	-0,01
<i>Centaurea calcitrapa</i>	17	17,18	0,18
<i>Centaurea calcitrapa</i>	17	17,03	0,03
<i>Centaurea calcitrapa</i>	17	16,75	-0,25
<i>Centaurea calcitrapa</i>	17	16,72	-0,28
<i>Plantago lanceolata</i>	19	19	0
<i>Plantago lanceolata</i>	19	19,23	0,23
<i>Plantago lanceolata</i>	19	18,85	-0,15
<i>Plantago lanceolata</i>	19	18,85	-0,15
<i>Anthemis cotula</i>	20	19,91	-0,09
<i>Anthemis cotula</i>	20	20,11	0,11
<i>Ammi viznaga</i>	18	17,75	-0,25
<i>Ammi viznaga</i>	18	18,31	0,31
<i>Ammi viznaga</i>	18	17,72	-0,28
<i>Ammi viznaga</i>	18	18,03	0,03

Anexo 5. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestra externa que se utilizó para validar la ecuación

Especie	Número de referencia	Resultado de predicción	Residual
<i>Trifolium repens</i>	1	0,548	-0,452
<i>Medicago sativa</i>	2	2,54	0,54
<i>Trifolium alexandrinum</i>	3	3,195	0,195
<i>Lotus corniculatus</i>	4	3,9	-0,1
<i>Trifolium pratense</i>	5	4,557	-0,443
<i>Rumex conglomeratus</i>	6	5,875	-0,125
<i>Silene gallica</i>	7	6,903	-0,097
<i>Carduus acanthoides</i>	8	8,062	0,062
<i>Rumex crispus</i>	9	9,002	0,002
<i>Echium plantagineum</i>	10	9,476	-0,524
<i>Rumex pulcher</i>	11	11,702	0,702
<i>Cirsium vulgare</i>	12	12,396	0,396
<i>Ammi majus</i>	13	13,144	0,144
<i>Coleostephus myconis</i>	14	13,608	-0,392
<i>Plantago myosurus</i>	15	14,185	-0,815
<i>Apium leptophyllum</i>	16	15,95	-0,05
<i>Centaurea calcitrapa</i>	17	17,263	0,263
<i>Ammi viznaga</i>	18	18,052	0,052
<i>Plantago lanceolata</i>	19	19,018	0,018
<i>Anthemis cotula</i>	20	19,584	-0,416

Anexo 6. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Echium plantagineum*.

Valores de Calibración			Valores de la Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	89,62	-0,08	89,70	82,26	-7,44
89,70	89,79	0,09	94,70	96,10	1,40
89,70	89,58	-0,12	97,70	95,49	-2,21
89,70	89,91	0,21	98,70	99,56	0,86
94,70	94,70	0,00	99,20	100,65	1,45
94,70	94,65	-0,05	99,70	102,20	2,50
94,70	94,86	0,16			
94,70	94,53	-0,17			
97,70	97,65	-0,05			
97,70	97,75	0,05			
97,70	97,61	-0,09			
97,70	97,87	0,17			
98,70	98,71	0,01			
98,70	98,65	-0,05			
98,70	98,59	-0,11			
98,70	98,39	-0,31			
99,20	99,22	0,02			
99,20	99,18	-0,02			
99,20	99,14	-0,06			
99,20	99,43	0,23			
99,70	99,66	-0,04			
99,70	99,83	0,13			
99,70	99,53	-0,17			
99,70	99,96	0,26			

Anexo 7. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Ammi majus*.

Valores de Calibración			Valores de Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	89,63	-0,07	89,70	87,20	-2,50
89,70	89,62	-0,08	94,70	95,86	1,16
89,70	89,79	0,09	97,70	99,69	1,99
89,70	89,84	0,14	98,70	96,44	-2,26
94,70	94,75	0,05	99,20	95,76	-3,44
94,70	94,56	-0,14	99,70	97,50	-2,20
94,70	94,47	-0,23			
94,70	95,09	0,39			
97,70	97,68	-0,02			
97,70	97,57	-0,13			
97,70	97,56	-0,14			
97,70	97,88	0,18			
98,70	98,74	0,04			
98,70	98,65	-0,05			
98,70	98,79	0,09			
98,70	98,80	0,10			
99,20	99,21	0,01			
99,20	99,10	-0,10			
99,20	98,88	-0,32			
99,20	98,82	-0,38			
99,70	99,74	0,04			
99,70	99,80	0,10			
99,70	99,86	0,16			
99,70	99,97	0,27			

Anexo 8. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Plantago myosurus*.

Valores de Calibración			Valores de Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	89,77	0,07	89,70	88,75	-0,95
89,70	89,61	-0,09	94,70	96,80	2,10
89,70	89,84	0,14	97,70	98,85	1,15
89,70	89,55	-0,15	98,70	98,42	-0,28
94,70	94,62	-0,08	99,20	98,44	-0,77
94,70	94,55	-0,15	99,70	97,97	-1,73
94,70	94,88	0,18			
94,70	94,99	0,29			
97,70	97,67	-0,03			
97,70	97,88	0,18			
97,70	98,02	0,32			
97,70	97,13	-0,57			
98,70	98,71	0,01			
98,70	98,75	0,05			
98,70	98,77	0,07			
98,70	98,82	0,12			
99,20	99,09	-0,11			
99,20	99,01	-0,19			
99,20	98,99	-0,21			
99,20	99,42	0,22			
99,70	99,74	0,04			
99,70	99,74	0,04			
99,70	99,78	0,08			
99,70	99,45	-0,25			

Anexo 9. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Coleostephus myconis*.

Valores de Calibración			Valores de Validación		
Pureza Física	Resultado Predicción	Residual	Pureza física	Resultado Predicción	Residual
89,7	89,64	-0,06	89,7	90,542	0,842
89,7	89,62	-0,08	94,7	94,866	0,166
89,7	89,57	-0,13	97,7	96,733	-0,967
89,7	90,03	0,33	98,7	98,831	0,131
94,7	94,64	-0,06	99,2	98,201	-0,999
94,7	94,9	0,2	99,7	98,031	-1,669
94,7	94,91	0,21			
94,7	94,47	-0,23			
97,7	97,69	-0,01			
97,7	97,64	-0,06			
97,7	97,83	0,13			
97,7	97,38	-0,32			
98,7	98,71	0,01			
98,7	98,86	0,16			
98,7	98,87	0,17			
98,7	98,39	-0,31			
99,2	99,3	0,1			
99,2	99,09	-0,11			
99,2	99,08	-0,12			
99,2	99,55	0,35			
99,7	99,78	0,08			
99,7	99,83	0,13			
99,7	99,53	-0,17			
99,7	99,5	-0,2			

Anexo 10. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Apium leptophyllum*.

Valores de la ecuación			Valores de Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	89,80	0,10	89,70	92,27	2,57
89,70	89,44	-0,26	94,70	96,56	1,86
89,70	89,20	-0,50	97,70	97,27	-0,43
89,70	90,51	0,81	98,70	97,86	-0,84
94,70	95,01	0,31	99,20	100,25	1,05
94,70	94,34	-0,36	99,70	100,01	0,31
94,70	94,29	-0,41			
94,70	95,49	0,79			
97,70	97,70	0,00			
97,70	97,81	0,11			
97,70	97,55	-0,15			
97,70	97,53	-0,17			
98,70	98,74	0,04			
98,70	98,59	-0,11			
98,70	98,86	0,16			
98,70	99,09	0,39			
99,20	99,15	-0,05			
99,20	99,60	0,40			
99,20	98,79	-0,41			
99,20	98,75	-0,45			
99,70	99,63	-0,07			
99,70	99,61	-0,09			
99,70	99,86	0,16			
99,70	99,46	-0,24			

Anexo 11. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Ammi viznaga*.

Valores de Calibración			Valores de Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	89,73	0,03	89,70	86,72	-2,98
89,70	89,66	-0,04	94,70	97,37	2,67
89,70	89,92	0,22	97,70	96,44	-1,26
89,70	89,39	-0,31	98,70	97,50	-1,20
94,70	94,73	0,03	99,20	97,44	-1,76
94,70	95,06	0,36	99,70	98,93	-0,77
94,70	94,26	-0,44			
94,70	95,40	0,70			
97,70	97,66	-0,04			
97,70	97,85	0,15			
97,70	97,48	-0,22			
97,70	98,39	0,69			
98,70	98,52	-0,18			
98,70	98,90	0,20			
98,70	98,20	-0,50			
98,70	99,29	0,59			
99,20	99,23	0,03			
99,20	98,93	-0,27			
99,20	98,80	-0,40			
99,20	98,69	-0,51			
99,70	99,73	0,03			
99,70	99,50	-0,20			
99,70	99,39	-0,31			
99,70	100,08	0,38			

Anexo 12. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Plantago lanceolata*.

Valores de Calibración			Valores de Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	89,68	-0,02	89,70	89,53	-0,17
89,70	89,62	-0,08	94,70	96,66	1,96
89,70	89,79	0,09	97,70	96,84	-0,86
89,70	89,90	0,20	98,70	98,98	0,28
94,70	94,73	0,03	99,20	98,93	-0,27
94,70	94,20	-0,50	99,70	97,77	-1,93
94,70	95,26	0,56			
94,70	95,27	0,57			
97,70	97,50	-0,20			
97,70	97,47	-0,23			
97,70	98,26	0,56			
97,70	97,04	-0,66			
98,70	98,69	-0,01			
98,70	98,60	-0,10			
98,70	97,95	-0,75			
98,70	99,60	0,90			
99,20	99,26	0,06			
99,20	98,96	-0,24			
99,20	98,76	-0,44			
99,20	99,69	0,49			
99,70	99,65	-0,05			
99,70	99,65	-0,05			
99,70	100,08	0,38			
99,70	99,19	-0,51			

Anexo 13. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Silene gallica*.

Valores de Calibración			Valores de la Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	90,00	0,30	89,70	87,56	-2,14
89,70	89,33	-0,37	94,70	94,36	-0,34
89,70	90,54	0,84	97,70	96,04	-1,66
94,70	94,65	-0,05	98,70	98,72	0,02
94,70	94,40	-0,30	99,20	99,86	0,66
94,70	95,25	0,55	99,70	100,12	0,42
94,70	93,79	-0,91			
97,70	97,60	-0,10			
97,70	97,84	0,14			
97,70	97,15	-0,55			
97,70	98,45	0,75			
98,70	98,74	0,04			
98,70	98,60	-0,10			
98,70	98,92	0,22			
98,70	98,47	-0,23			
99,20	98,91	-0,29			
99,20	99,64	0,44			
99,20	99,84	0,64			
99,20	98,43	-0,77			
99,70	99,61	-0,09			
99,70	99,60	-0,10			
99,70	99,82	0,12			
99,70	99,52	-0,18			

Anexo 14. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Carduus acanthoides*.

Valores de Calibración			Valores de Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	89,87	0,17	89,70	87,39	-2,32
89,70	89,51	-0,19	94,70	99,25	4,55
89,70	90,09	0,39	97,70	98,19	0,49
89,70	89,21	-0,49	98,70	97,31	-1,40
94,70	94,40	-0,30	99,20	97,72	-1,48
94,70	95,48	0,78	99,70	99,43	-0,28
94,70	95,72	1,02			
97,70	97,82	0,12			
97,70	97,50	-0,20			
97,70	97,91	0,21			
97,70	98,00	0,30			
98,70	98,67	-0,03			
98,70	98,00	-0,70			
98,70	97,94	-0,76			
98,70	99,52	0,82			
99,20	98,90	-0,30			
99,20	98,86	-0,34			
99,20	99,90	0,70			
99,20	98,30	-0,90			
99,70	99,55	-0,15			
99,70	99,41	-0,29			
99,70	99,35	-0,35			
99,70	100,18	0,48			

Anexo 15. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Centaurea calcitrapa*.

Valores de Calibración			Valores de Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	89,67	-0,03	89,70	89,55	-0,15
89,70	89,31	-0,39	94,70	97,98	3,28
89,70	89,11	-0,59	97,70	96,91	-0,79
89,70	90,61	0,91	98,70	97,50	-1,20
94,70	94,59	-0,11	99,20	97,09	-2,11
94,70	95,65	0,95	99,70	98,76	-0,94
94,70	95,69	0,99			
94,70	96,51	1,81			
97,70	97,76	0,06			
97,70	97,82	0,12			
97,70	97,55	-0,15			
97,70	97,36	-0,34			
98,70	99,04	0,34			
98,70	98,10	-0,60			
98,70	99,60	0,90			
98,70	97,58	-1,12			
99,20	98,74	-0,46			
99,20	98,62	-0,58			
99,20	98,41	-0,79			
99,20	97,58	-1,62			
99,70	99,98	0,28			
99,70	100,18	0,48			
99,70	100,41	0,71			
99,70	98,92	-0,78			

Anexo 16. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Anthemis cotula*.

Valores de Calibración			Valores de Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	89,34	-0,36	89,70	90,34	0,64
89,70	90,14	0,44	94,70	95,03	0,33
89,70	91,14	1,44	97,70	97,66	-0,04
89,70	87,92	-1,78	98,70	97,15	-1,55
94,70	95,04	0,34	99,20	98,18	-1,02
94,70	95,10	0,40	99,70	100,26	0,56
94,70	96,17	1,47			
94,70	96,46	1,76			
97,70	97,74	0,04			
97,70	98,36	0,66			
97,70	96,69	-1,01			
97,70	98,78	1,08			
98,70	98,61	-0,09			
98,70	98,54	-0,16			
98,70	98,48	-0,22			
98,70	97,87	-0,83			
99,20	99,28	0,08			
99,20	99,02	-0,18			
99,20	98,79	-0,41			
99,20	98,37	-0,83			
99,70	99,87	0,17			
99,70	99,21	-0,49			
99,70	99,10	-0,60			
99,70	98,75	-0,95			

Anexo 17. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Rumex crispus*.

Valores de Calibración			Valores de Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	90,56	0,86	89,70	87,74	-1,96
89,70	88,74	-0,96	94,70	98,66	3,96
89,70	88,51	-1,19	97,70	98,07	0,37
89,70	90,96	1,26	98,70	99,35	0,65
94,70	94,80	0,10	99,20	98,15	-1,05
94,70	95,04	0,34	99,70	99,05	-0,65
94,70	96,40	1,70			
94,70	96,69	1,99			
97,70	97,46	-0,24			
97,70	97,33	-0,37			
97,70	98,43	0,73			
97,70	96,90	-0,80			
98,70	98,56	-0,14			
98,70	98,56	-0,14			
98,70	98,85	0,15			
98,70	100,01	1,31			
99,20	98,73	-0,47			
99,20	98,49	-0,71			
99,20	98,38	-0,82			
99,20	98,06	-1,14			
99,70	99,78	0,08			
99,70	99,59	-0,11			
99,70	99,02	-0,68			
99,70	98,94	-0,76			

Anexo 18. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Rumex conglomeratus*.

Valores de Calibración			Valores de Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	89,11	-0,59	89,70	87,90	-1,81
89,70	88,95	-0,75	94,70	94,57	-0,14
89,70	90,60	0,90	97,70	99,20	1,50
89,70	90,71	1,01	98,70	98,10	-0,60
94,70	95,20	0,50	99,20	98,53	-0,67
94,70	95,46	0,76	99,70	97,83	-1,87
94,70	93,26	-1,44			
94,70	96,91	2,21			
97,70	97,73	0,03			
97,70	97,93	0,23			
97,70	98,53	0,83			
97,70	98,60	0,90			
98,70	98,99	0,29			
98,70	99,23	0,53			
98,70	99,34	0,64			
98,70	97,81	-0,89			
99,20	99,06	-0,14			
99,20	98,96	-0,24			
99,20	99,47	0,27			
99,20	98,43	-0,77			
99,70	99,42	-0,28			
99,70	98,53	-1,17			
99,70	98,40	-1,30			
99,70	98,15	-1,55			

Anexo 19. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Cirsium vulgare*.

Valores de Calibración			Valores de Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	89,76	0,06	89,70	91,69	1,99
89,70	89,37	-0,33	94,70	89,95	-4,75
89,70	90,70	1,00	97,70	97,16	-0,54
89,70	90,94	1,24	98,70	99,35	0,65
94,70	94,76	0,06	99,20	99,12	-0,09
94,70	94,52	-0,18	99,70	102,17	2,47
94,70	95,42	0,72			
94,70	96,09	1,39			
97,70	98,00	0,30			
97,70	97,35	-0,35			
97,70	98,40	0,70			
97,70	99,72	2,02			
98,70	98,26	-0,44			
98,70	99,25	0,55			
98,70	98,05	-0,65			
98,70	96,32	-2,38			
99,20	98,68	-0,52			
99,20	97,87	-1,33			
99,20	97,62	-1,58			
99,20	97,00	-2,20			
99,70	100,27	0,57			
99,70	100,48	0,78			
99,70	98,90	-0,80			
99,70	101,06	1,36			

Anexo 20. Cuadro que resume los valores de predicción para cada muestras que integra la ecuación de calibración y predicción para Trébol blanco + *Rumex pulcher*.

Valores de Calibración			Valores de Validación		
Pureza física	Resultado predicción	Residual	Pureza física	Resultado predicción	Residual
89,70	89,49	-0,21	89,70	90,60	0,90
89,70	89,31	-0,39	94,70	97,18	2,48
89,70	88,95	-0,75	97,70	95,91	-1,79
89,70	91,43	1,73	98,70	98,02	-0,68
94,70	96,52	1,82	99,20	99,19	-0,01
94,70	96,77	2,07	99,70	98,55	-1,15
94,70	97,58	2,88			
94,70	98,11	3,41			
97,70	97,48	-0,22			
97,70	97,08	-0,62			
97,70	98,52	0,82			
97,70	99,33	1,63			
98,70	98,49	-0,21			
98,70	98,23	-0,47			
98,70	97,81	-0,89			
98,70	97,60	-1,10			
99,20	99,09	-0,11			
99,20	99,00	-0,20			
99,20	98,42	-0,78			
99,20	97,48	-1,72			
99,70	98,77	-0,93			
99,70	98,51	-1,19			
99,70	97,70	-2,00			
99,70	97,11	-2,59			