



LETHÍCIA OLÍMPIO BUENO

**USO DA INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL PARA A AVALIAÇÃO
DA COR INSTRUMENTAL DE CARNE BOVINA**

**LAVRAS – MG
2023**

LETHÍCIA OLIMPIO BUENO

**USO DA INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL PARA A AVALIAÇÃO DA COR
INSTRUMENTAL DE CARNE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos
Orientador

Prof. Dr. Danton Diego Ferreira
Coorientador

**LAVRAS – MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Bueno, Lethícia Olimpio.

Uso da inteligência artificial para a avaliação da cor
instrumental de carne bovina / Lethícia Olimpio Bueno. - 2023.
100 p.

Orientador(a): Eduardo Mendes Ramos.

Coorientador(a): Danton Diego Ferreira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Mioglobina. 2. Redes Neurais Artificiais. 3. Qualidade de
Carne. I. Ramos, Eduardo Mendes. II. Ferreira, Danton Diego.
Título.

LETHÍCIA OLIMPIO BUENO

**USO DA INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL PARA A AVALIAÇÃO DA COR
INSTRUMENTAL DE CARNE BOVINA**

**USE OF ARTIFICIAL INTELLIGENCE FOR THE EVALUATION OF THE
INSTRUMENTAL COLOR OF BEEF**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 18 de janeiro de 2023.

Profª Drª Alcinéia de Souza Lemos Ramos (UFLA)

Prof Dr Armando Abel Massingue (UEM, Moçambique)

Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos
Orientador

Prof. Dr. Danton Diego Ferreira
Coorientador

**LAVRAS – MG
2023**

DEDICATÓRIA

“Cor em uma imagem é como entusiasmo na vida.”

Vincent Van Gogh

**À minha família,
DEDICO!**

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é trabalho de mais de uma pessoa, há muitas mãos que diretamente e indiretamente contribuíram para concluir este projeto. Não posso deixar de mencionar primeiramente minha família. Agradeço meu pai, que mesmo não estando mais entre nós, deu um objetivo de vida para mim e para minha irmã, compartilhamos juntos um sonho. Conseguimos, pai! Somos duas meninas formadas e independentes. Agradeço minha mãe, sempre o alicerce de todos, me passando segurança a cada passo que perguntei o que fazer, pelo amor, dedicação a mim e por ter me gerado, afinal, é minha primeira casa. Agradeço minha irmã, pela cumplicidade e parceria, por ser a minha melhor companhia e a garantia que sempre está e estará ao meu lado. Agradeço meu parceiro Alfredo, são anos compartilhando o mesmo espaço, as alegrias, as dificuldades e por simplesmente desejar fazer isso diariamente, te amo! Todos vocês sempre tiveram fé em mim e me incentivaram a continuar conquistando meu sonho a cada etapa da minha vida. Minha família toda, que saudade de todos vocês!

Meus agradecimentos são estendidos aos meus mestres. Prof. Eduardo, há tantos anos trabalhando juntos e sempre com muita troca de conhecimento, conversas e orientação. Ao Prof. Danton, primeiramente por creditar a uma ideia, e, com muita maestria conduziu e fez esse conceito sair do papel. A Prof.^a Alcinéia, são anos me guiando e dando suporte em minha trajetória, afinal, muito do que sou hoje é por causa de vocês! Peça chave neste projeto, foi a Cecília, orientada pelo Prof. Danton, oportunizou que uma parte deste projeto acontecesse, foi mais que uma ajuda, foi uma pesquisa em conjunto. Meus amigos do LabCarnes, vocês são demais! Obrigada por vestirem o jaleco e ir para o laboratório comigo, muito café e sufoco passamos juntos, mas isso que os torna tão especiais, apesar das dificuldades em conduzir uma pesquisa em terras brasileiras, nenhum de vocês deixaram de sonhar e fazer pesquisa! Lô, você é meu braço direito!

Agradeço a Universidade Federal de Lavras, que me acolhe e continua a oferecer suporte para estudar. À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio no financiamento no projeto (CVZ APQ 02904-17) e pela bolsa de estudos concedida para fazer esse mestrado. Ao corpo docente da instituição, que lecionaram e abriram seus laboratórios para passar seus conhecimentos, além de todos os demais colaboradores que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

Obrigada! Definitivamente sem o suporte de todos vocês, nada disto teria sido possível.

*“precisei apagar
para iluminar”* } *algumas coisas*

-Perina

RESUMO

A cor desempenha um papel importante na avaliação da qualidade de carne, sendo o principal atributo sensorial avaliado pelos consumidores e influenciando significativamente suas decisões de compra. A cor da carne é oriunda do pigmento mioglobina e das três formas químicas que pode assumir: deoximioglobina, oximioglobina e metamioglobina. Embora os colorímetros tenham um custo elevado e uma representação limitada da superfície da carne, bem como as limitações dos métodos propostos para quantificar as formas redox da mioglobina, estes são os métodos cientificamente aceitos para análise de cor instrumental. Alternativamente, o processamento de imagens utilizando a inteligência artificial é uma possibilidade para superar as subjetividades e dificuldades, além do baixo custo, rapidez, objetividade e sem deterioração das amostras. Desta forma, nesta dissertação dois artigos foram desenvolvidos para explorar, compreender e avaliar estes fenômenos. No primeiro artigo, descreve-se as mudanças de cor do corte de contrafilé (*Longissimus lumborum*) durante a oxigenação e oxidação dos pigmentos através dos métodos tradicionais de quantificação das formas químicas (K/S e Krzywicki) e feita a associação aos dados colorimétricos, além da discutir as formas de se obter os padrões de 100% dos pigmentos para referência. As formas químicas da mioglobina foram obtidas de acordo com os protocolos da AMSA (2012), a oxigenação foi avaliada por 60 minutos, refrigerado a 4°C com leituras a cada 10 minutos e para a descoloração durante o armazenamento, acompanhou-se por 8 dias (2°C) com leituras a cada 24h. Concluiu-se que os parâmetros de cor e pigmentos são relacionados, mas descrevem informações diferentes, como a cor descrevendo melhor a aparência dos bifes e a mudança dos pigmentos, a evolução temporal. Também concluiu que os métodos para predição das formas químicas diferem, o modelo dos pontos isobéticos (K/S) descreve mais coerentemente o comportamento de acordo com o que é esperado das transformações químicas, além dos índices c^* e h° serem bons parâmetros para avaliar as mudanças na cor da carne. No segundo artigo, desenvolveu-se um sistema de visão computacional (SVC) utilizando uma rede neural artificial do tipo *Multi Layer Perceptron* (MLP) para a quantificação das formas químicas da mioglobina na superfície dos bifes de contrafilé a partir de imagens obtidas tanto por uma câmera fotográfica, quanto de um smartphone e testadas quanto a necessidade de calibração das imagens. Avaliou-se pelo colorímetro e pelos SVC as mesmas amostras descritas no primeiro artigo. Após o treinamento do algoritmo, foram escolhidas as duas melhores MLP's com acurácia média de $92,62\% \pm 2,22$ na classificação dos pigmentos. A predição das MLP's foi correlacionada com o método matemático de Krzywicki, demonstrando que os SVC foram capazes de acompanhar as mudanças dos pigmentos e, em algumas ocasiões, tiveram resultados superiores na predição. Em conclusão, esta dissertação contribui para a literatura que procura explicar a análise de cor instrumental de carnes e como esta se relaciona com os pigmentos em diversas situações reais que a carne bovina pode ser submetida, além da abordagem inovadora da IA para a quantificação das formas químicas da mioglobina, adequando as metodologias com as tecnologias disponíveis.

Palavras-chave: Cor instrumental. Imagem. Qualidade da carne. Colorímetro. Inteligência artificial. Visão computacional. Mioglobina.

ABSTRACT

Color plays an important role in the evaluation of meat quality, being the main sensory attribute evaluated by consumers and significantly influencing their purchasing decisions. The color of meat originates from the myoglobin pigment and the three chemical forms it can assume: deoxymyoglobin, oxymyoglobin, and metmyoglobin. Although colorimeters have a high cost and a limited representation of the meat surface, as well as limitations of proposed methods to quantify the redox forms of myoglobin, they are the scientifically accepted methods for instrumental color analysis. Alternatively, image processing using artificial intelligence is a possibility to overcome subjectivities and difficulties, in addition to being low cost, fast, objective, and without sample deterioration. Thus, in this dissertation, two articles were developed to explore, understand, and evaluate these phenomena. In the first article, color changes of the strip loin (*Longissimus lumborum*) were described during pigments' oxygenation and oxidation through traditional quantification methods (K/S and Krzywicki) of chemical forms (redox) and associated with colorimetric data. The ways to obtain 100% pigment standards for reference were also discussed. The redox forms of myoglobin were obtained according to the AMSA (2012) protocols. Oxygenation was evaluated for 60 minutes, refrigerated at 4°C with readings every 10 minutes, and for discoloration during storage, monitored for 8 days (2°C) with readings every 24 hours. It was concluded that color parameters and pigments are related but describe different information, such as color better describing the appearance of steaks and pigment changes, the temporal evolution. It was also concluded that the methods for predicting chemical forms differ, the isobestic points model (K/S) more coherently describing the behavior according to the expected chemical transformations, besides the c^* and h° indices being good parameters to understand the changes in meat color. In the second article, the development of a computer vision system (CVS) using a Multi-Layer Perceptron (MLP) artificial neural network for quantifying myoglobin's chemical forms on the surface of strip loin steaks from images obtained from both a digital camera and a smartphone was evaluated, and the need for image calibration was tested. The same samples described in the first article were evaluated by both the colorimeter and the CVS. After algorithm training, the two best MLPs with an average accuracy of $92.62\% \pm 2.22$ in classifying pigments were chosen. The MLPs' predictions were correlated with the mathematical Krzywicki method, demonstrating that CVSs were able to track pigment changes and, in some cases, had superior prediction results. In conclusion, this dissertation contributes to the literature that seeks to explain the instrumental color analysis of meat and how it relates to pigments in various real situations that beef can be subjected to, as well as the innovative approach of artificial intelligence for quantifying myoglobin's chemical forms, adapting methodologies to available technologies.

Keywords: Instrumental color. Image. Meat quality. Colorimeter. Artificial intelligence. Computer vision. Myoglobin.

SUMÁRIO

PARTE UM	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Cor	13
2.2 O pigmento de mioglobina	15
2.3 Análise instrumental da cor em carnes	19
2.4 Sistemas de cores	20
2.4.1 Sistema RGB.....	20
2.4.2 Sistemas da CIE	21
2.4.3 Iluminantes.....	22
2.4 Inteligência computacional	23
2.4.1 <i>Machine Learning</i>	25
2.4.2 Redes neurais artificiais	25
2.4.3 Visão computacional e o processamento de imagens	27
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	29
REFERÊNCIAS.....	29
PARTE DOIS - ARTIGOS.....	37
ARTIGO 1 - Cor da carne em números: compreendendo as formas redox da mioglobina e a cor CIELAB	38
ARTIGO 2 - Predição das formas redox da mioglobina na carne bovina via visão computacional.....	75
APÊNDICE A – Condução das análises utilizando os SVC	99
APÊNDICE B – Sumário e Registo da MLP no INPI	100

PARTE UM

1 INTRODUÇÃO

A aparência e a cor dos alimentos são os primeiros parâmetros sensoriais de qualidade para o consumidor, sendo essencial para a aceitação ou não do produto. No caso da carne bovina, a decisão de compra é diretamente influenciada mais pela cor, do que por outro fator, visto que há uma dificuldade em avaliar os demais atributos utilizando somente a visão.

A princípio, a cor da carne é determinada pela quantidade de pigmentos e pela distribuição de três formas químicas da mioglobina: deoximioglobina (DMb), de cor vermelho púrpura; oximioglobina (OMb), de cor vermelho brilhante; e metamioglobina (MMb), de cor amarronzada. Estas três formas coexistem na carne *in natura*, cuja cor percebida aos olhos é a do pigmento presente em maior proporção.

Em carnes bovinas, os consumidores relacionam a cor vermelho brilhante da OMb ao frescor e à saudabilidade, enquanto a cor marrom da MMb é considerada indesejável, mas sabe-se que a cor da superfície continua mudando durante o armazenamento da carne. Logo, compreende-se que a eficiência da venda dos cortes bovinos depende da capacidade de manter a cor atrativa durante todo seu tempo de exposição. No Brasil, habitualmente remove-se os cortes cárneos das embalagens à vácuo, porcionando-os e reembalando-os em um sistema de alta permeabilidade de oxigênio que a princípio favorece a formação de OMb. Porém, a exposição contínua ao oxigênio favorece a reação da oxidação da mioglobina, gerando então a MMb, reduzindo seu *display-life*, ou seja, o tempo de exposição nas gôndolas, mesmo antes de perder sua vida útil (*shelf-life*).

O acompanhamento destas mudanças é importante para se definir estratégias de otimização das condições de estocagem e comercialização, além de estimar qual o tempo mais adequado para comercialização da carne em função da sua aparência. Quanto a avaliação da cor, um dos problemas mais relevantes é o funcionamento dos equipamentos e metodologias para obtenção de informações significativas para comparar e avaliar os produtos.

A determinação da cor pode ser realizada a partir de instrumentos específicos, como os colorímetros, comumente aceitos e reconhecidos na comunidade científica. Entretanto, há uma grande limitação em seu uso, pois a medição de cor é em pequenas regiões, ou seja, a leitura é feita em uma área reduzida (no tamanho da abertura da porta do instrumento, cerca de 2 a 5 cm² de área superficial) e, embora isso seja repetido em locais diferentes, não é possível uma leitura da totalidade da superfície da carne, implicando também na predição dos cálculos das formas químicas da mioglobina. Outro grande inconveniente destes equipamentos é o seu custo elevado.

Apesar da grande maioria das pesquisas sobre cor de carnes serem baseadas nos índices obtidos por um colorímetro, a análise de imagens via visão Computacional (VC) tem sido sugerida, pois permite a visualização integral da amostra, sendo capaz de fazer uma varredura em todos os *pixels* para estimar a cor em sua heterogeneidade (defeitos, por exemplo), em um processo não destrutivo e objetivo, além de preciso e automatizado. Neste sistema, os valores RGB das imagens digitalizadas podem ser convertidos para a escalas como CIELab por meio de modelos matemáticos. Contudo, a tecnologia de gerenciamento digital de cores tem evoluído de forma a preservar o máximo possível a fidelidade cromática de uma imagem quando visualizada como imagem digital, ou seja, quando visualizada no monitor, uma foto tirada por uma câmera digital deve ser a mesma ou muito semelhante à realidade.

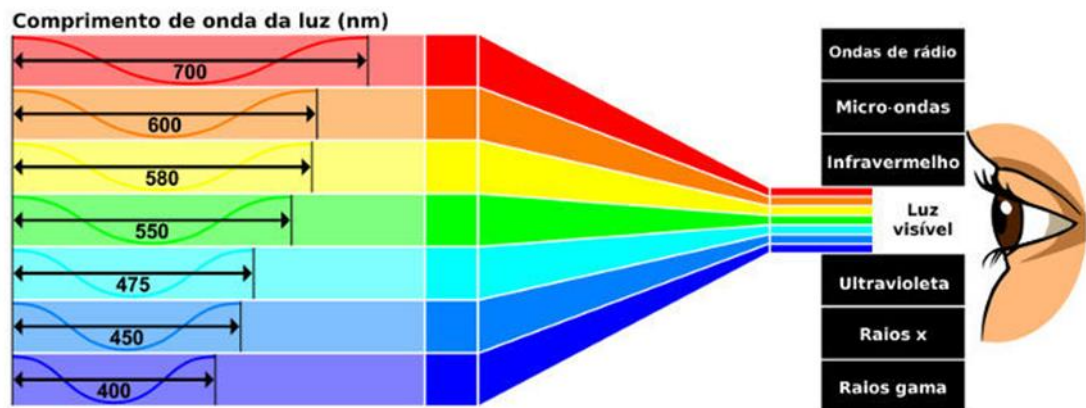
De acordo com tendências do mundo digital, o uso de celulares e câmeras para fotografar e a implementação de algoritmos é simples, não invasiva, não destrutiva, econômica e rápida. Não obstante, este trabalho teve como proposta investigar a mudança da cor da carne e dos pigmentos relativos à mioglobina durante os processos de oxigenação e armazenamento através do colorímetro, além de propor um sistema de visão computacional (protótipo alternativo) de baixo custo para a avaliação da cor e quantificação dos pigmentos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cor

O espectro eletromagnético é um conjunto de frequências (ou comprimento de ondas), que incluem desde as ondas de rádios até raios gama, as cores são faixas de ondas possíveis de serem vistas pelos olhos humanos localizadas no espectro visível (380 a 780nm) (RAMOS; GOMIDE, 2017) (Figura 2.1).

Figura 2.1 Espectro visível da luz.



Fonte: HELERBROCK (2023)

Como a percepção é única de cada indivíduo, a cor não existe de forma tangível, é uma impressão produzida na retina do olho pela luz refletida/difundida pelos objetos. Por este motivo, a cor não é uma característica intrínseca e permanente, pois está em constante mudança, visto que a posição e a luz que incide sobre os objetos dá diferentes percepções das cores (PANISSON, 2016; DELAZARI, 2019).

A visão e percepção humana das cores é um processo complexo, o sistema ocular recebe e emite informações ao cérebro, fazendo possível as sensações visuais. O recebimento destas informações é através dos fotorreceptores: os cones e os bastonetes (DELTA COLOR BRASIL, 2021). No centro da retina, existe uma pequena depressão chamada fóvea onde são encontrados os cones, os responsáveis por nossa visão colorida. O olho humano é capaz de captar fótons com comprimento de onda entre 380 e 780 nanômetros e converte essa energia em impulso elétrico, que é levado ao cérebro e interpretado, os cones são estimulados pelos fótons nas faixas do vermelho, verde e azul, segundo a conclusão dos físicos Young e Helmholtz, na teoria

tricromática, e as demais cores são combinações das cores primárias da luz para recriar todo o espectro. Os bastonetes são células que registram apenas a presença ou ausência de luz, sendo sensíveis ao movimento, forma, textura e pequenas variações da intensidade luminosa.

Os alimentos possuem cor devido a capacidade de refletir, refratar ou absorver diferentes quantidades de energia em comprimentos de ondas que são capazes de estimular toda a retina.

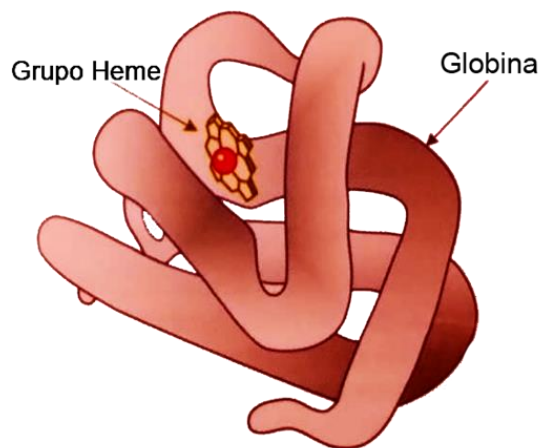
A cor também é um sistema tridimensional, possui matiz, luminosidade e saturação. Matiz é a característica que diferencia uma cor da outra, é a cor em si em sua máxima intensidade, o que é conhecido como tom é a gradação cromática do matiz, ou seja, uma variação qualitativa da cor relacionada com o comprimento de onda no espectro do visível (INSTITUTO DE ARTE UNICAMP, 2021). A luminosidade é a quantidade de luz branca que incide sobre a cor, o que define para os humanos o que é uma cor clara ou escura. Já a saturação, é o quanto a cor se afasta da cor neutra, ou seja, quanto mais saturada é a cor, menos presença de branco ou preto (luminosidade) (DELAZARI, 2019). Por mais simples que possa parecer, a descrição das cores é bastante complexa, além de cada indivíduo ter seu próprio sistema de visão, a sensibilidade pode ser afetada pelo tempo e também pelo meio onde a pessoa habita, pessoas que moram em cidades maiores tendem a desenvolver uma percepção melhor para diferentes tons de cinza, por exemplo (RAMOS; GOMIDE, 2017).

Há também o problema de linguagem, a definição de nomes para as cores é extremamente cultural, regional e dependente do meio que está inserida a discussão (GIANOTTI, 2019), ao dizer que a cor da carne *in natura* é vermelho cereja, o pesquisador pressupõe equivocadamente que o leitor tenha o mesmo conceito da cor vermelho cereja. O modo que falamos, ouvimos ou lemos as cores são particulares da compressão do mundo de cada indivíduo (FRASER; BANKS, 2007). Portanto, há a necessidade de expressar as cores em modelos matemáticos capazes de representá-las numericamente, conhecidos como sistemas de cores, propostos para utilização científica. Desta forma, possibilita a padronização de metodologias de análises, conhecimento sobre estado de conservação e maturação dos alimentos para, inclusive, uma adequada estratégia de vendas.

2.2 O pigmento de mioglobina

A mioglobina é o principal pigmento responsável pela cor em carnes, é uma proteína conjugada que consiste em um grupo prostético (grupo heme) ligado a uma proteína globular (globina), conforme demonstrado na Figura 2.2. A estrutura do grupo heme e o estado químico do átomo de ferro presente são pontos chaves para a mudança de cor em carnes através de reações sofridas pelos pigmentos da mioglobina (RAMOS; GOMIDE, 2017).

Figura 2.2 – Estrutura da mioglobina, composta pela proteína (globina) + grupo prostético (grupo heme).



Fonte: Ramos & Gomide (2017)

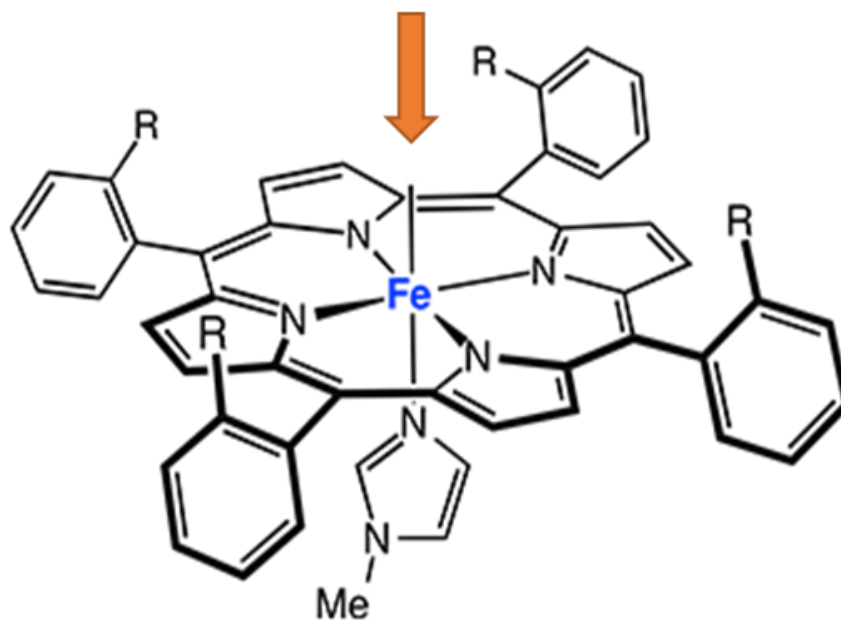
O grupo heme possui um átomo de ferro que pode ser encontrado em diferentes formas químicas (*redox forms*), sendo as três principais associadas a carne *in natura*: deoximioglobina (DMb), a oximioglobina (OMb) e a metamioglobina (MMb) (MANCINI; HUNT, 2005).

A manutenção do pigmento mioglobina é essencial para se preservar as características visuais da carne, sabe-se que entre os três estados, o que tem maior aceitação nas vendas é o estado oxigenado, ou seja, da OMb, embora atualmente a carne a vácuo, com a DMb predominante tem sido bem aceita pelos consumidores, principalmente quanto a vida útil desses cortes, segundo (CARDOSO *et al.*, 2013; CARDOSO; 2016). Os pigmentos encontrados majoritariamente na carne *in natura* são a DMb, OMb e MMb, que coexistem na superfície da carne.

O estado químico dos pigmentos da carne está relacionado ao estado de oxidação do ferro, o tipo de ligante na sexta posição de valência do ferro-heme (Figura 2.3), o estado da globina e também da integridade do anel de porfirina e do núcleo da hematina.

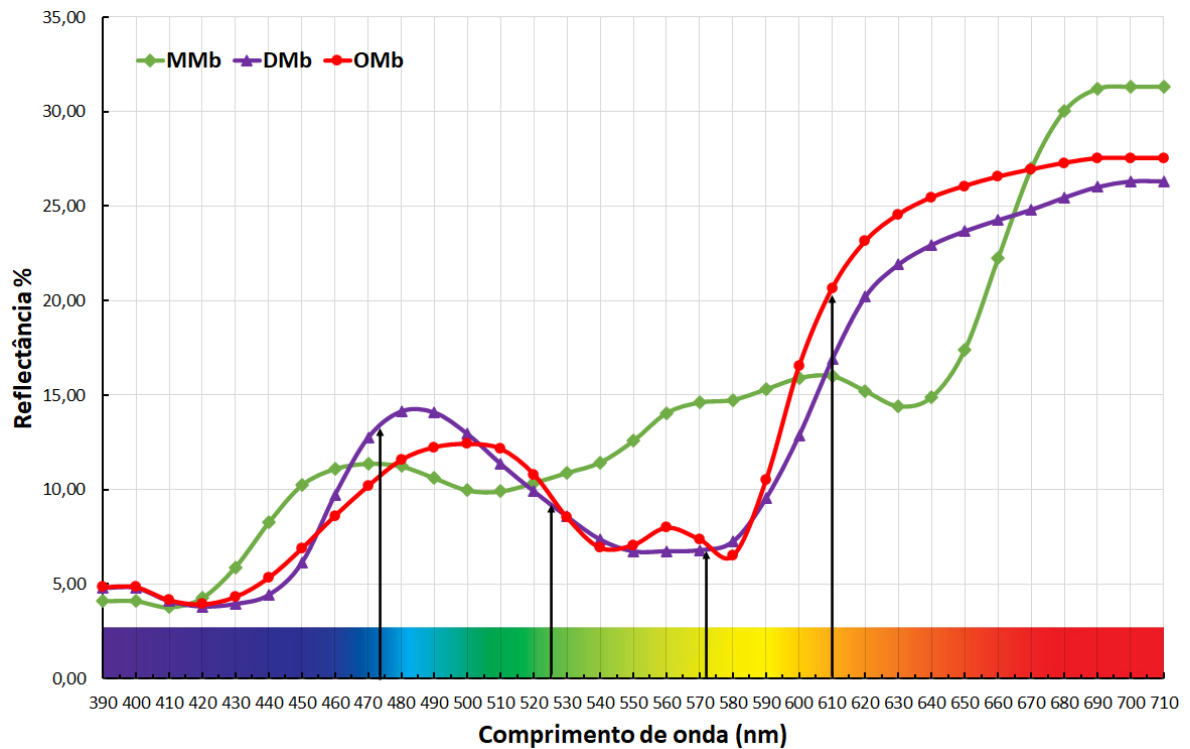
A DMb é formada em condições em que há uma baixa pressão e quantidade de oxigênio, sendo o único pigmento que permanece na configuração penta valente, ou seja, com a sexta coordenada sem qualquer ligação, seu espectro de reflectância (Figura 2.4) tem máximo na região do azul e outro na região do vermelho, um mínimo entre 540 e 580nm (região verde/amarelo), conferindo a este pigmento um tom vermelho arroxeadado (Figura 2.5), geralmente encontrado no interior do músculo após seccionado ou carnes que estão embaladas à vácuo.

Figura 2.3- Grupo heme e em destaque (flecha) a 6ª valência do ferro heme.



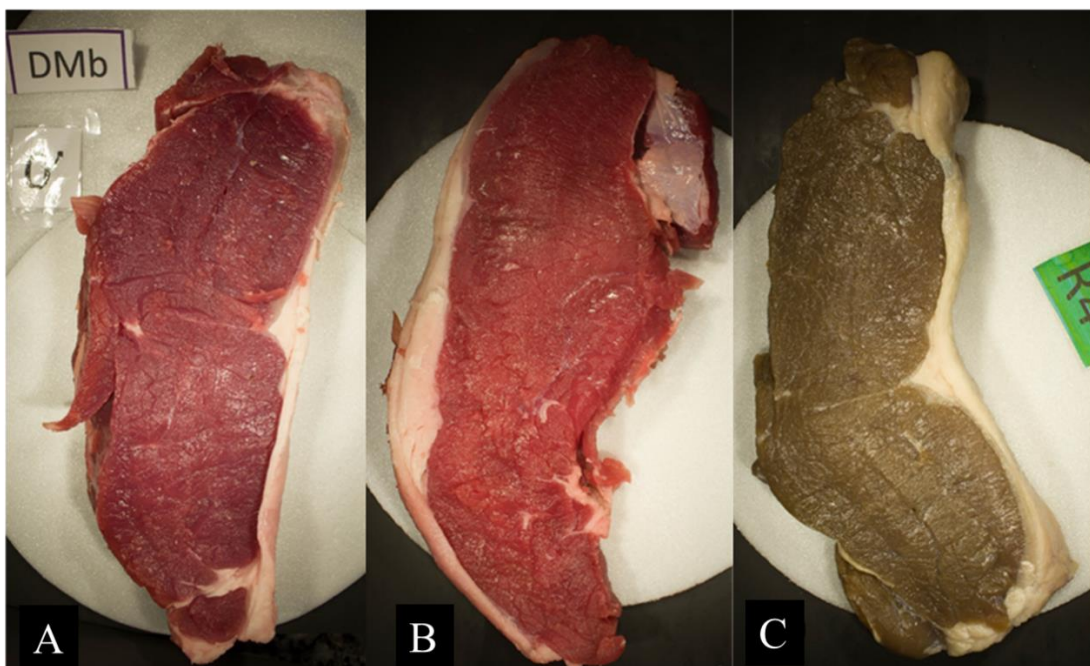
Fonte: Modificado de Wikipedia (2023) CC BY-SA 3.0
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Myoglobin>).

Figura 2.4- Reflectância e comprimentos de ondas isobásticos utilizados na determinação das formas químicas da mioglobina.



Fonte: Da autora (2023).

Figura 2.5- Pigmentos derivados (formas químicas) da mioglobina.



A) Deoximioglobina (DMb), B) Oximioglobina (OMb), e C) Metamioglobina (MMb).

Fonte: Da autora (2023).

Quando o oxigênio começa a se ligar ao grupo heme, este processo é conhecido como oxigenação, ou ainda, *blooming*. O *blooming* refere-se a mudança da cor da carne devido a oxigenação da mioglobina que ocorre quando a superfície da carne é exposta ao oxigênio (JACOB, 2020). A extensão da mudança de cor depende do tempo, espécie animal, pH, temperatura em que está ocorrendo a exposição, logo, as definições para a medição da oxigenação devem ser detalhadas nos projetos. A profundidade da camada em que o oxigênio se difunde e o tempo para conclusão são parâmetros que influenciam na cor da superfície e no espectro de reflectância (JOSE *et al.*, 2022). O pigmento formado neste processo é a OMb, é uma forma ferrosa estável sob altas pressões de oxigênio e, o sítio fica ocupado pelo O₂, uma das características do seu espectro é a formação de duas depressões, uma em 540 e a outra em 580 e entre elas um aumento da reflectância no comprimento de onda de 560nm, formando ao centro do espectro uma forma semelhante a letra W, além de um máximo na região do vermelho e um breve declínio na região do azul, caracterizando um tom de vermelho mais vibrante (HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Este pigmento já começa a se tornar predominante e detectável a partir de 30 minutos de oxigenação (BUENO *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2008; LINDAHL *et al.*, 2006), intimamente associado ao frescor da carne pelos consumidores. Ao decorrer do tempo e das condições, o oxigênio pode penetrar na superfície da carne e mais vívida a cor vermelha (AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION, 2012; RAMOS; GOMIDE, 2017; HOLMAN *et al.*, 2015).

A terceira forma química é a MMb (Figura 2.5), nesta condição os derivados ferrosos da mioglobina encontram-se oxidados se alterando para ferro férrico (Fe⁺³), nesta configuração o sítio fica indisponível para ligações (sexta valência), ou seja, impossibilita a ligação com gases, mas encontra-se ligada com a água, que se liga ao íon de férrico pela doação de elétrons na ligação. Este pigmento tem tom amarronzado (RAMOS; GOMIDE, 2017), característico de carne cozida ou carne salgada, porém para carnes in natura é extremamente indesejável, pois está associada a extenuação da carne. Essa reação de oxidação acontece durante o armazenamento na presença do gás oxigênio, ou seja, o pigmento OMb passa pelo processo de auto oxidação por se tratar de uma reação que contém O₂ (agente oxidante), formando então, a MMb. A oxidação da DMb para MMb é favorecida em temperaturas mais elevadas, luz ultravioleta (UV), pH < 5,5 ou na presença de agentes oxidantes, como cloreto de sódio, nitrito de sódio e ferricianeto de potássio. A curva da MMb também possui sinais distintivos, diferentemente dos pigmentos anteriores, ela possui uma concentração mais elevada de reflectância entre 520nm a 580 e uma depressão em aproximadamente 630nm, conferindo um

tom menos vívido e amarronzado na carne bovina. A evolução deste espectro é relatada em diferentes espécies de gados, independente de raça ou músculo, mas em diferentes velocidades, a depender das condições da amostra analisada (SALUEÑA *et al.*, 2019; HERNÁNDEZ *et al.*, 2015; AMSA, 2012; BJELANOVIC *et al.*, 2013; PIAO *et al.*, 2022).

2.3 Análise instrumental da cor em carnes

Tradicionalmente a avaliação da qualidade da carne bovina envolve a inspeção visual humana, além de experimentos de determinação química, biológica (RAHMAN *et al.*, 2020) e físicas. A análise instrumental da cor em carnes é comumente feita através do uso de colorímetros. Os protocolos se baseiam em uma leitura de 3 a 5 pontos na superfície da carne (AMSA, 2012), e a porta do colorímetro varia entre 2 à 8 mm de diâmetro, a depender da escolha da metodologia, logo, entende-se que a mensuração é feita em uma área reduzida, pois esses pontos podem não ser uma boa representação de toda a amostra.

A carne tem uma superfície óticamente não homogênea devido a sua estrutura, tecido conjuntivo e gordura intramuscular. A superfície da carne é rugosa e dispersa aleatoriamente a luz que é emitida pelo colorímetro (GIROLAMI *et al.*, 2013). A cor de uma superfície com essas características depende tanto da quantidade de espalhamento de luz e o comprimento de onda eletromagnético refletido. Esses dois últimos aspectos podem variar em relação a quantidade de luz que ilumina a amostra e pode penetrar na matriz da carne, e da distância das amostras da fonte de luz (KONICA MINOLTA, 1998). O colorímetro mede a luz espalhada em uma área restrita da superfície da carne, dando apenas uma avaliação pontual da cor sem qualquer outra informação da variabilidade da amostra. Pela porosidade do plano da carne, a luz do colorímetro pode penetrar até 20 mm, segundo estudo de Girolami (2013). Em sua conclusão (GIROLAMI, 2013), é apontado que, então, o colorímetro faz a leitura do interior da carne pela difusão da luz, ou seja, a resposta que se tem de cor no equipamento é diferente do que é visto pelo consumidor, pois é detectado a deoximioglobina do interior do músculo, de tom vermelho púrpura, juntamente com a OMb da superfície (RAMOS; GOMIDE, 2017).

Já a avaliação de cores pela visão computacional (VC) pode substituir o colorímetro, pois a distribuição de cores de amostras não homogêneas pode ser quantificada em sua totalidade (BROSNAN & SUN, 2004; HUAMÁN, 2019), além de avaliar somente a superfície da amostra, se assemelhando mais da avaliação sensorial. É um método não destrutivo, eficiente, de baixo custo, confiável, reprodutíveis, consistente, podendo ser online (CHMIEL

et al., 2016; GÜMÜS *et al.*, 2011; YAGIZ *et al.*, 2009). Métodos de imagem foram recentemente aplicados com sucesso para avaliar visualmente a qualidade ou classificar a carne e outros alimentos na linha de processamento em características de cor, forma, tamanho e textura de superfície (RAHMAN *et al.*, 2020; GIROLAMI *et al.*, 2013). Além disso, potencialmente a VC pode substituir a visão humana e a percepção de imagens na avaliação da qualidade da carne, que acelera e tona o processo de mensuração mais consistente (RAHMAN *et al.*, 2020).

2.4 Sistemas de cores

As cores devem ser expressas numericamente para que seja possível não somente a análise de dados, mas a garantia que a cor expressa é igualmente entendida por todas as partes do mundo, para isto, torna-se essencial a existência dos sistemas de cores para proferir estas informações colorimétricas.

2.4.1 Sistema RGB

O modelo RGB é um espaço de cores tridimensional no sistema cartesiano, suas coordenadas são dadas por *Red*, *Green* e *Blue* (GONZALEZ; WOODS, 2010). O sistema é dependente da luz transmitida e está presente nos equipamentos digitais, como os monitores, telas de celulares e câmera digitais (SILVA *et al.*, 2022). A cor digital das imagens é representada na forma RGB com três componentes por *pixel* no intervalo de 0 a 255 cada componente. As cores (primárias) emitidas por este sistema aditivo são processadas nos olhos e no cérebro, interpretando os vários comprimentos de ondas. As diferentes quantidades e combinações dessas três cores são o suficiente para formar qualquer outra cor, descrito também na teoria tricromática de Young e Helmholtz (1802). Embora esse sistema represente muito bem o comportamento da cor em raios de luz, seja amplamente aplicado e se aproximem bem do como vê-se as cores, a quantidade de cores que podem ser geradas pelo modelo ainda é longe de atingir a totalidade de cores que podem ser vistas por humanos (RAMOS & GOMIDE, 2017).

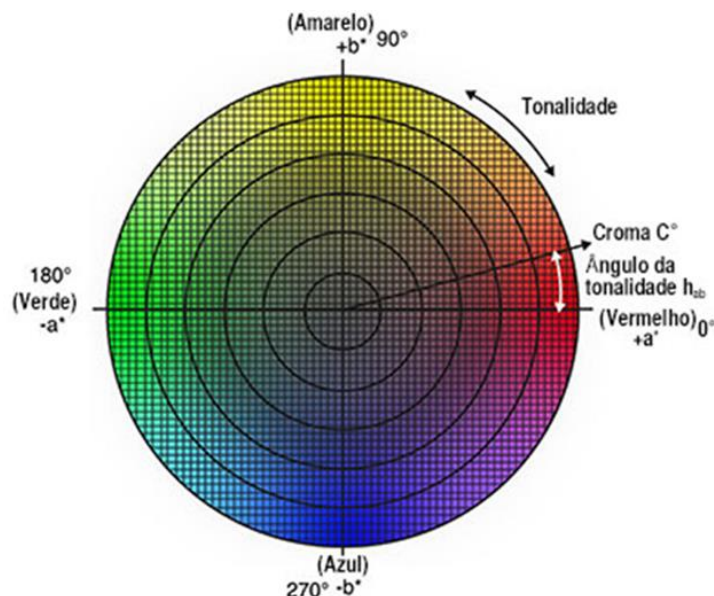
Para melhor representação numérica da cor, a *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIE) padronizou o pico das curvas de sensibilidade dos comprimentos de ondas: azul é 435,8 nm, verde é 546,1 nm e vermelho é 700,0 nm (GONZALEZ; WOODS, 2010; HUNT, 1991).

O sistema RGB não é um sistema absoluto, sendo dependente do tipo de sensor que obteve a imagem, a iluminação, a distância entre o sensor e a amostra, além da necessidade de calibração com um instrumento com padrões de cores (LEÓN *et al.*, 2006; LARRAIN *et al.*, 2008; GIROLAMI *et al.*, 2013).

2.4.2 Sistemas da CIE

A CIE definiu três espaços de cor, sendo um deles o CIE $L^*a^*b^*$ (ou CIELAB) para a comunicação e expressão das cores, o mais comum na área de alimentos. Este sistema foi criado após a teoria de cores opostas: duas cores não podem ser verdes e vermelhas ao mesmo tempo, ou amarelas e azuis. A distância euclidiana entre duas diferentes cores, corresponde aproximadamente à diferença de cor percebida pelos olhos humanos. O parâmetro L^* representa a luminosidade, varia de 0 a 100, sendo 0 a ausência total de luz, ou seja, amostras com valores baixos de L^* são mais escuras enquanto amostras com valores altos de L^* são mais claras. Os componentes cromáticos são o a^* e b^* e variam entre +120 e -120. Valores positivos de a^* indica tons de vermelho, por este motivo, na área de carnes é comumente chamado de índice de vermelho, e valores negativos, tons de verde. Quanto a componente b^* , $+b^*$ representa tons amarelos e $-b^*$ tons de azul. $L^*a^*b^*$ é representado em coordenadas cartesianas, um sistema muito similar ao CIELAB é o CIELCH (Figura 2.6), que é a representação do sistema em coordenadas polares, o intercâmbio entre ambos os sistemas é feito através de modelo matemáticos (KONICA MINOLTA, 2023).

Figura 2.6 - Círculo cromático



Fonte: Konica Minolta (2023).

2.4.3 Iluminantes

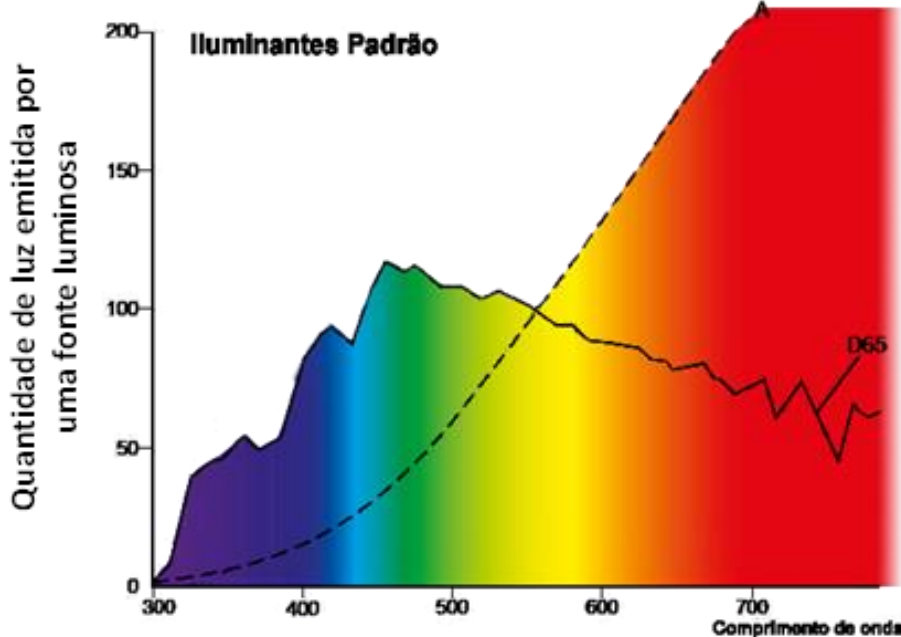
Uma fonte de luz pode ser definida como um objeto que emite luz, ela é dependente de energia para iluminar, como o sol e as lâmpadas. Forma então, a curva de distribuição de energia espectral (Figura 2.7), uma luz emite diferentes quantidades de energia em cada comprimento de onda do espectro de cores visíveis (KONICA MINOLTA, 2023).

Ao contrário de uma fonte de luz, um iluminante não é um objeto físico, mas sim uma representação matemática da curva de distribuição de energia espectral de uma fonte de luz, que por sua vez, o objeto pode ser submetido e afeta a percepção das cores. O iluminante também pode-se caracterizar por sua temperatura de cor, que expressa a aparência de cor de luz emitida pela fonte de luz (RAMOS; GOMIDE, 2017). Partindo destes princípios, torna-se possível a criação de fontes de luzes com características específicas, ou seja, não há mais dependência das fontes luminosas reais.

Em 1971, a CIE definiu vários iluminantes com a finalidade de representar certas fontes de luz. Estes iluminantes e seus dados espectrais são usados com o intuito de medir a cor de uma amostra tal como seu comportamento sob cada fonte. Alguns deles são:

- Iluminante A: radiação emitida por uma luz de incandescente (tungstênio) de temperatura de cor 2856K;
- Iluminante D65: irradiação solar média diária de temperatura de cor 6504K incluída a região do ultravioleta;
- Iluminantes F2: Simula a luz fluorescente branca fria de temperatura de cor de 4230K.

Figura 2.8- Distribuição espectral de energia radiante relativa do iluminante A e D65.



Fonte: Modificado de Konica Minolta (2023).

A escolha do iluminante é dependente do produto/alimento a ser analisado. Na área de ciência e qualidade de carnes, comumente utiliza-se o iluminante A para as análises de carne *in natura*, pois há altas correlações entre os valores instrumentais e sensoriais, provavelmente pela maior proporção de comprimentos de onda na faixa do vermelho (RAMOS; GOMIDE 2017), conforme ilustrado na Figura 2.8.

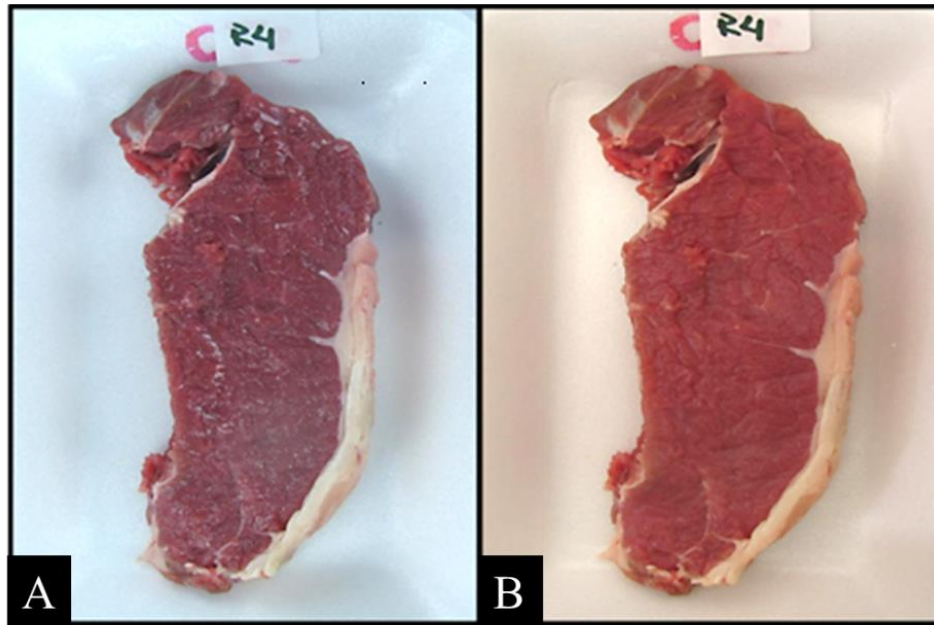
2.5 Inteligência computacional

A Inteligência Artificial é um dos campos mais recentes da ciência e engenharia, um campo que se tornou ciência em 1987 e que busca não só compreender, mas também construir entidades inteligentes (RUSSEL; NORVIG, 2013). Atualmente a IA é um campo universal, multidisciplinar que abrange uma variedade de subcampos, dos mais gerais (aprendizado e percepção) até tarefas mais específicas.

A Inteligência Computacional (IC) é uma sucessora da IA, definida por Poole *et al.* (1998) como “o estudo do projeto de agentes inteligentes”, implementando entidades que integram elementos de aprendizagem, adaptação, evolução e sistemas de lógica que são capazes de aprender e tratar novas situações (BARBON, 2018; MAULIK *et al.*, 2010), simulando a

capacidade de adaptação e aprendizagem da natureza e/ou do comportamento humano em tarefas determinadas (GOLDSCHIMIDT, 2010 e HASSANIEN *et al.*, 2013).

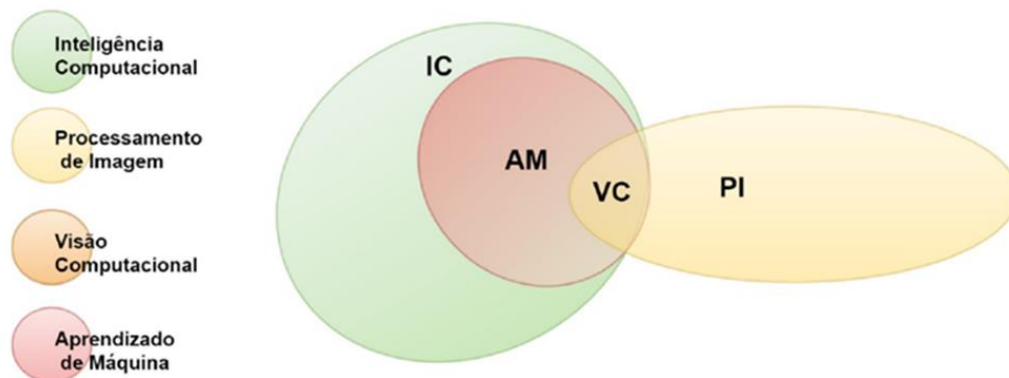
Figura 2.8 – Influência na cor aparente de carnes bovina oxigenadas utilizando o (A) iluminantes A; e (B) iluminante D65.



Fonte: Da autora (2023).

Na Figura 2.9, está ilustrada como as áreas se correlacionam entre a IC, Processamento de Imagem, Aprendizado de Máquina e Visão Computacional (VC), estes campos da computação estão inseridos neste trabalho.

Figura 2.9- Relação entre as áreas da computação.



Fonte: BARBON (2018).

2.5.1 *Machine Learning*

Considerado um subconjunto da Inteligência Computacional, o Aprendizado de Máquina (*Machine Learning*) exibe o “aprendizado” experiencial associado à inteligência humana, além de ter a capacidade de aprender e melhorar suas análises por meio do uso de algoritmos computacionais, conectados a ferramentas matemáticas e estatísticas (BARBON, 2018; COSTA FILHO *et al.*, 2019; HELM *et al.*, 2020).

Em geral, os algoritmos dos modelos necessitam de um grande conjunto de entrada e saída de dados para serem treinados e posteriormente capazes de reconhecer padrões, fazer recomendações ou até mesmo decisões anônimas, precisamente. Quando suas saídas são avaliadas por um especialista, esta abordagem é conhecida como aprendizagem supervisionada. Após sucessivas repetições e ajustes no algoritmo, a máquina torna-se capaz de receber uma entrada e prever uma saída (HELM *et al.*, 2020; RUSSEL; NORVIG, 2013). As saídas são então comparadas com um conjunto de resultados conhecidos para julgar a precisão do algoritmo, que é então ajustado iterativamente para aperfeiçoar a capacidade de prever outros resultados.

2.5.2 **Redes neurais artificiais**

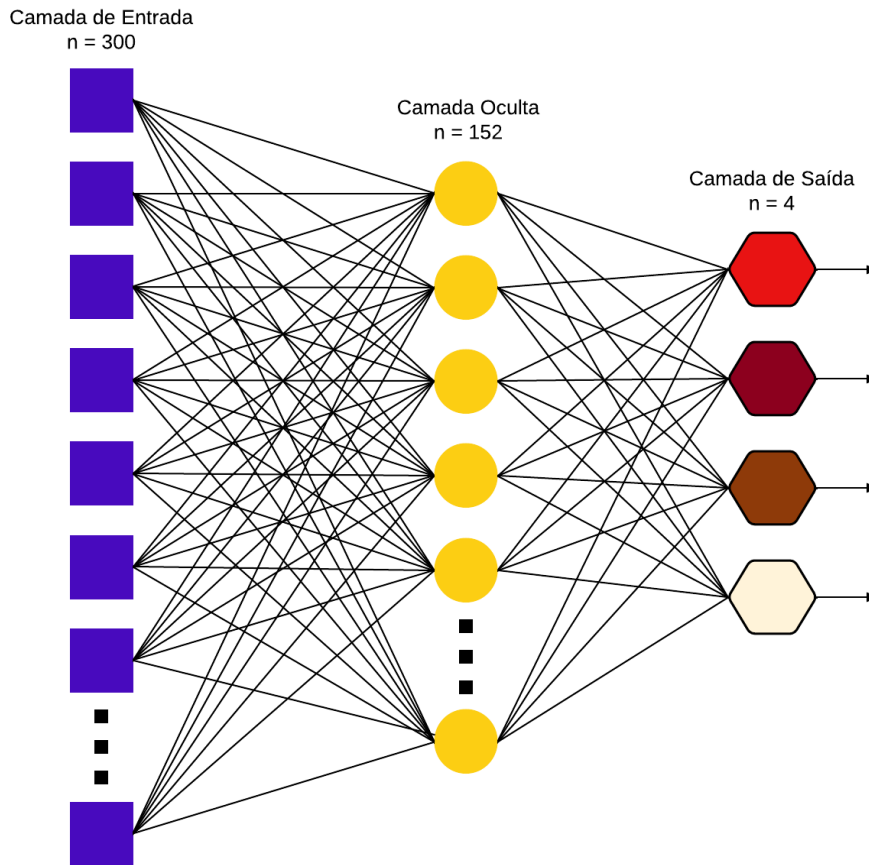
Redes Neurais Artificiais (RNA) são técnicas computacionais que apresentam um modelo matemático inspirado na estrutura neural de organismos inteligentes (neurônios) e que adquirem conhecimento através da experiência, que, no caso das máquinas é por meio dos treinamentos (CARVALHO, 2009).

Uma RNA é composta por centenas ou milhares de unidades de processamento, cujo funcionamento é bastante simples. A maioria dos modelos de redes neurais são especificadas e possuem alguma regra de treinamento, onde os pesos de suas conexões são ajustados de acordo com os padrões apresentados, ou seja, aprendem através de exemplos. As arquiteturas neurais são tipicamente organizadas em camadas (Figura 2.10), geralmente classificadas em três grupos (CARVALHO, 2009):

- Camada de Entrada: onde é apresentado os padrões à rede;
- Camadas Intermediárias ou Camadas Escondidas: onde é feita a maior parte do processamento, através das conexões ponderadas; sendo consideradas como extratoras de características;

- Camada de Saída: onde o resultado é concluído e apresentado.

Figura 2.10 - Representação da arquitetura da MLP utilizada no Artigo 2



Fonte: Da autora (2023).

A RNA utilizada neste trabalho é uma *Multi-Layer Perceptron* (MLP), uma RNA de aprendizado supervisionado de retro propagação. Esta arquitetura é mais robusta, possuindo um maior número de neurônios e camadas, comparadas à outras RNA's como a Adaline, Perceptron, sendo assim, é o modelo mais encontrado nas soluções envolvendo pesquisa em carnes, pois são problemas mais complexos que necessitam de soluções não lineares e não triviais (Barbon, 2018; Chandraratne *et al.*, 2006; Gosukonda *et al.*, 2015), como o trabalho desenvolvido pelos autores Chandraratne *et al.* (2006) para predição de maciez de carne de cordeiro utilizando uma VC juntamente com uma MLP, obtendo um R de 0,746 utilizando características geométricas e variáveis de textura de carne de cordeiro para a predição da maciez, e Gosokunda *et al.* (2015) desenvolveu modelos de MLP para quantificar a inativação de *Escherichia coli* O157:H7 em superfícies de carne bovinas como uma ferramenta para utilização *online* pela indústria da carne, obtendo $R^2 > 0,96$, uma alta correlação dos dados experimentais com a predição da MLP.

2.5.3 Visão computacional e o processamento de imagens

A visão computacional (VC) é a ciência que estuda e desenvolve algoritmos numéricos para a extração de informações de uma imagem para uma posterior análise de dados. É uma técnica não invasiva, não destrutiva, baixo custo, rápida e objetiva (PIRES, 2019).

Uma possível aplicação deste sistema é na avaliação da cor de alimentos, as informações de cores das imagens digitais ficam armazenadas em estruturas de dados que representam pixels de uma imagem, e sua representação vetorial das cores geralmente utiliza o a matriz tridimensional RGB, em que cada pixel está associado a um valor de cor RGB elementar (BROSNAN; SUN, 2004; GUNASEKARAN, 1996). A visão computacional fornece ferramentas para caracterização de superfície em nível de pixel e é uma técnica promissora para medição de cor de alimentos (MINZ *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2013). Para a utilização da visão computacional, é necessário a aquisição das imagens, para isto faz-se essencial a montagem de um sistema, constituído de uma câmera, um iluminante, a amostra e um computador com software para o processamento de imagens.

O sistema de visão computacional tornou-se uma ferramenta bastante útil por suas múltiplas funcionalidades, como o monitoramento em tempo real de aspectos visuais, aquisição de imagens durante trabalho em andamento, medição de características geométricas, textura da superfície, avaliação e garantia da qualidade dos produtos na indústria de alimentos (GUNASEKARAN, 1996; MINZ *et al.*, 2021), pois esses sistemas têm a capacidade de adquirir as propriedades visuais de toda a superfície da amostra dos alimentos, portanto os resultados são mais representativos com os parâmetros sensoriais que os resultados colorimétricos (CHEN *et al.*, 2010; MINZ *et al.*, 2021). Na área de qualidade de carnes, alguns estudos têm sido realizados utilizando a visão computacional para propor a resolução de algum problema ou uma nova metodologia para avaliação da qualidade de carnes processadas (FERREIRA, 2019). Tais como exemplos, Girolami *et al.* (2013) compararam as técnicas de Visão Computacional (VC) e o colorímetro para avaliação da qualidade da carne, afirmando que o colorímetro não gerou coordenadas correspondentes à verdadeira cor da carne, porém seu sistema forneceu medições válidas que reproduz uma cor muito semelhante à real. Passetti (2016) concluiu que as imagens digitais promoveram uma situação mais padronizada para as avaliações, portanto as imagens digitais podem ser utilizadas para avaliar a evolução da cor. Ferreira (2019) utilizou a VC com algoritmo k-NN de acurácia de 78,95% para classificar carcaças de bovinos nelore e afirmou que os algoritmos de classificação implementados mostraram um bom desempenho em relação

ao sistema tradicional. Barbon *et al.* (2017) classificou o músculo *longissimus dorsi et lumborum* de bovinos e suínos de acordo com o grau de marmoreio, utilizando a RNA k-NN com 81,59% de acurácia para classificar os bovinos e 76,14% para suínos. Já Huamán (2019) avaliou a estabilidade da cor em filés de burriquete através do sistema de visão computacional e concluiu como uma interessante ferramenta para avaliar a cor e a sua estabilidade na carne de pescado e que esse sistema também pode ser utilizado em outros tipos de alimentos. O uso do sistema de visão computacional deve ser considerado como uma alternativa aos métodos tradicionais de medição da cor de carnes de fibras brancas, de acordo com a conclusão do estudo de Tomasevic *et al.* (2019), visto que as cores observadas pelo sistema são mais similares as amostras do que as observadas pelo colorímetro. Por ora, a visão computacional tem uma desvantagem distinta, com a aplicação para análise de imagens digitais, é restrita a identificação e extração de características externas presentes na imagem, como cor, tamanho, estrutura e textura da superfície (RAHMAN *et al.*, 2020; CHMIEL *et al.*, 2011).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Buscar novos métodos e metodologias faz parte de ser cientista, e, revisar, questionar métodos já propostos é o diferencial que torna o conhecimento uma fonte ininterrupta, pois conforme o tempo passa, novas descobertas e tecnologias surgem e são agregadas às nossas rotinas.

Quanto ao trabalho desenvolvido, revisar os diferentes métodos de quantificação das formas químicas da mioglobina, demonstrou que apesar da praticidade de utilizar o método matemático de Krzywicki, este possui algumas falhas se comparado com o método de K/S quanto aos valores absolutos dos pigmentos, mas ainda sim é capaz de acompanhar as mudanças ou as diferenças das proporções, o que satisfaz as pesquisas que tem interesse em avaliar o comportamento das formas químicas durante determinado tratamento, como a deterioração progressiva da carne bovina no armazenamento.

Outro resultado deste trabalho foi a utilização de uma inteligência artificial do tipo *Multi Layer Perceptron* para a classificação dos pigmentos da superfície da carne bovina, sendo pioneira até o momento de publicação deste estudo. Os resultados dos sistemas de visão computacional (SVC) demonstraram alta confiabilidade, devido a análise criteriosa a cada área de 100 px² por uma área mais representativa do que a metodologia tradicional que utiliza o colorímetro, além do fato da leitura ser superficial, se assemelhando muito mais ao que é observado sensorialmente pelo consumidor. Como pontos positivos do uso de um SVC, assim como um colorímetro, a análise é não destrutiva, mas a SVC pode ser mais facilmente implantada em uma linha fabril ou até mesmo nas salas de aula, pois é necessário somente uma ferramenta de captura de imagem e um algoritmo, o que tem um custo muito inferior à um colorímetro, democratizando a análise de cor instrumental.

Como sugestões para dar continuidade à esta linha de pesquisa, sugere-se calcular as formas químicas da mioglobina pelo método de K/S para comparação dos dados obtidos pelo SVC, ampliar a base de dados para treinamento para que se tenha ainda mais variabilidade e detecte com maior precisão as nuances que a carne bovina pode apresentar, além de aumentar o número de amostras avaliadas e diferentes cortes cárneos. Ademais, implementar no SVC a segmentação das imagens, desta forma será possível reconhecer a amostra cárnea na imagem sem prévio recorte e como resultado, será possível a leitura da totalidade da área superficial dos bifés. Recomenda-se implantar uma saída de dados colorimétricos em CIELABCH da área analisada total e das diferentes porções classificadas, a fim de correlacionar com os dados

colorimétricos obtidos pelo colorímetro. Outro passo a ser tomado é a condução de uma análise sensorial para relacionar as proporções de pigmentos, os dados instrumentais de cor com a percepção humana para que possa inferir pontos em que a carne bovina deixa de ser desejável, portanto, o processo passará a ter sempre os mesmos critérios, minimizando a subjetividade, além da maior rapidez e automatização.

REFERÊNCIAS

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. **Meat Color Measurement Guidelines**. Champaign: Amsa, 2012. 136 p.

BARBON, Ana Paula Ayub da Costa *et al.* Development of a flexible Computer Vision System for marbling classification. **Computers And Electronics In Agriculture**, [S.L.], v. 142, p. 536-544, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compag.2017.11.017>.

BARBON, Ana Paula Ayub da Costa. **Avaliação do Índice de marmoreio e do tempo de estocagem da carne com o uso da Inteligência Computacional**. 2018. 58 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

BJELANOVIC, Milena; SØRHEIM, Oddvin; SLINDE, Erik; PUOLANNE, Eero; ISAKSSON, Tomas; EGELANDSDAL, Bjørg. Determination of the myoglobin states in ground beef using non-invasive reflectance spectrometry and multivariate regression analysis. **Meat Science**, [S.L.], v. 95, n. 3, p. 451-457, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.021>.

BROSNAN, Tadhg; SUN, Da-Wen. Improving quality inspection of food products by computer vision—a review. **Journal Of Food Engineering**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 3-16, jan. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0260-8774\(03\)00183-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0260-8774(03)00183-3).

BUENO, L.O.; RAMOS, A.L.S.; RAMOS, E.M. Influência da temperatura e do tempo de oxigenação na cor da carne bovina *in natura*. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO, 7., e CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 13., 2015. Búzios-RJ. **Anais...Búzios: CBMNVHA**, 2015. 5p.

CARDOSO, G. C. P. ; SILVA, D. R. G. ; CARDOSO, G. P. ; PINHEIRO, A. C. M. ; RAMOS, A. L. S. ; RAMOS, E. M. . Avaliação instrumental e sensorial da cor da carne bovina *in natura* exposta em display refrigerado. In: XIV Congresso Argentino de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CYTAL), 2013, Rosario / Argentina. XIV Congresso Argentino de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CYTAL), **Anais...** 2013.

CARDOSO, Giselle Pereira; DUTRA, Monalisa Pereira; FONTES, Paulo Rogério; RAMOS, Alcinéia de Lemos Souza; GOMIDE, Lúcio Alberto de Miranda; RAMOS, Eduardo Mendes. Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail display. **Meat Science**, [S.L.], v. 114, p. 85-94, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.012>.

CARVALHO, André Ponce de Leon F. de. **Redes Neurais Artificiais**. 2009. Department of Computer Science - University of São Paulo. Disponível em: <https://sites.icmc.usp.br/andre/research/neural/>. Acesso em: 28 set. 2022.

CHANDRARATNE, M.R.; SAMARASINGHE, S.; KULASIRI, D.; BICKERSTAFFE, R.. Prediction of lamb tenderness using image surface texture features. **Journal Of Food Engineering**, [S.L.], v. 77, n. 3, p. 492-499, dez. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.06.063>.

CHEN, K. *et al.* Color grading of beef fat by using computer vision and support vector machine. **Computers And Electronics In Agriculture**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 27-32, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compag.2009.08.006>.

CHMIEL, Marta; SŁOWIŃSKI, Mirosław; DASIEWICZ, Krzysztof. Lightness of the color measured by computer image analysis as a factor for assessing the quality of pork meat. **Meat Science**, [S.L.], v. 88, n. 3, p. 566-570, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.02.014>.

CHMIEL, Marta; SŁOWIŃSKI, Mirosław; DASIEWICZ, Krzysztof; FLOROWSKI, Tomasz. Use of computer vision system (CVS) for detection of PSE pork meat obtained from m. semimembranosus. **Lwt - Food Science And Technology**, [S.L.], v. 65, p. 532-536, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.021>.

COSTA FILHO, Sérgio Vinícius Serejo da *et al.* Configuração de algoritmos de aprendizado de máquina na modelagem florestal: um estudo de caso na modelagem da relação hipsométrica. **Ciência Florestal**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 1501-1515, 10 dez. 2019. Universidad Federal de Santa Maria. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509828392>.

DELAZARI, L. S. **Cartografia temática: teoria das cores**. Curitiba: Ufpr, 2019. 36 slides, color. Disponível em: https://docs.ufpr.br/~luciene/files/2019_GA126_aula6.pdf. Acesso em: 15 abr. 2021

DELTA COLOR BRASIL. **Espectrofotômetro x Colorímetro**. Disponível em: <https://www.deltacolorbrasil.com/espectrofotometroXcolorimetro.html>. Acesso em: 07 maio 2021.

FERREIRA, Guilherme Agostinis. **Utilização de visão computacional na classificação de carcaças de bovinos nelore macho**. 2019. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

FRASER, Tom; BANKS, Adam. **Guia completo da cor**. Segunda edição. São Paulo: Senac São Paulo, 2007

GIANOTTI, Marco Garaude. **Cor e linguagem**. 2019. Disponível em: https://sites.usp.br/marcogiannotti/cor-e-linguagem/#_ftn2. Acesso em: 16 jun. 2021.

GIROLAMI, A. *et al.* Measurement of meat color using a computer vision system. **Meat Science**, v.93, n.1, p.111-118, 2013.

GOLDSCHMIDT, Ronaldo Ribeiro. **Uma Introdução à Inteligência Computacional: fundamentos, ferramentas e aplicações**. Rio de Janeiro: Ist Rio, 2010. Disponível em: <http://www.boente.eti.br/fuzzy/ebook/ebook-fuzzy-goldschmidt.pdf>. Acesso em: 03 out. 2022.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento digital de imagens**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010. 624 p.

GOSUKONDA, Ramana *et al.* Application of artificial neural network to predict *Escherichia coli* O157: h7 inactivation on beef surfaces. **Food Control**, [S.L.], v. 47, p. 606-614, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.002>.

GÜMÜS, Bahar; BALABAN, Murat O.; UNLUSAYIN, Mustafa. Machine Vision Applications to Aquatic Foods: A Review. **Turkish Journal Of Fisheries And Aquatic Sciences**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 171-181, 2011. Central Fisheries Research Institute (SUMAE). <http://dx.doi.org/10.4194/trjfas.2011.0124>.

GUNASEKARAN, Sundaram. Computer vision technology for food quality assurance. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 7, n. 8, p. 245-256, ago. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10028-5](http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244(96)10028-5).

HASSANIEN, Aboul Ella *et al.* Computational intelligence techniques in bioinformatics. **Computational Biology And Chemistry**, [S.L.], v. 47, p. 37-47, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiochem.2013.04.007>.

HELERBROCK, Rafael. **Espectro eletromagnético**. 2023. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/fisica/espectro-eletromagnetico.htm>. Acesso em: 18 jun. 2023.

HELM, J. Matthew *et al.* Machine Learning and Artificial Intelligence: definitions, applications, and future directions. **Current Reviews In Musculoskeletal Medicine**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 69-76, 25 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12178-020-09600-8>.

HERNÁNDEZ, B.; SÁENZ, C.; ALBERDI, C.; DIÑEIRO, J. M.. Comparison between two different methods to obtain the proportions of myoglobin redox forms on fresh meat from reflectance measurements. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 52, n. 12, p. 8212-8219, 19 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-015-1917-x>.

HOLMAN, Benjamin W.B. *et al.* Lamb meat colour values (HunterLab CIE and reflectance) are influenced by aperture size (5mm v. 25mm). **Meat Science**, [S.L.], v. 100, p. 202-208, fev. 2015. Elsevier BV <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.10.006>.

HUAMÁN, Rosmer; ROSA, Giordan Fernandes da; PRENTICE, Carlos. Avaliação e estabilidade da cor em filés de burriquete (Pogonias cromis) utilizando um sistema de visão computacional. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 1-10, 13 jun. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.08815>.

HUNT, R. G. Colour displays and colorimetry. In: TOWNSEND, K. G.; JACKSON, G. B. **TV and video engineer's reference book**. Oxford: Butterworth-heinemann, 1991. cap. 9, p.1-12

INSTITUTO DE ARTES DA UNICAMP. **Luz e Cor**. Disponível em: https://hosting.iar.unicamp.br/lab/luz/ld/Cor/luz_e_cor_.pdf. Acesso em: 15 abr. 2021

JACOB, Robin. Implications of the variation in bloom properties of red meat: a review. **Meat Science**, [S.L.], v. 162, p. 108040, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108040>.

KONICA MINOLTA. **Compreenda os iluminantes padrão na medição de cor**. Disponível em: <https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/compreenda-os-iluminantes-padrao-na-medicao-de-cor/>. Acesso em: 09 janeiro de 2023

KONICA MINOLTA. **Compreendendo o Espaço de Cor CIE L*C*h**. 2023. Disponível em: <https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/compreendendo-o-espaco-de-cor-cie-lch/>. Acesso em: 09 jan. 2023.

KONICA MINOLTA. **Comunicação precisa da cor**: controle de qualidade da percepção à instrumentação. Japan: AEBDPK, 1998.

LARRAÍN, R. E.; SCHAEFER, D. M.; REED, J. D. Use of digital images to estimate CIE color coordinates of beef. **Food Research International**, v.41, n.4, p. 380-385, 2008.

LEE, M.s.; APPLE, J.K.; YANCEY, J.W.s.; SAWYER, J.T.; JOHNSON, Z.B.. Influence of wet-aging on bloom development in the longissimus thoracis. **Meat Science**, [S.L.], v. 80, n. 3, p. 703-707, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.03.013>.

LEÓN, K. *et al.* Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. **Food Research International**, v. 39, n. 10, p. 1084-1091, 2006.

LINDAHL, Gunilla; YOUNG, Jette F.; OKSBJERG, Niels; ANDERSEN, Henrik J.. Influence of dietary creatine monohydrate and carcass cooling rate on colour characteristics of pork loin from different pure breeds. **Meat Science**, [S.L.], v. 72, n. 4, p. 624-634, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.09.024>.

MANCINI, R.A., HUNT, M.C. Current research in meat color. **Meat Science**, 71:100-121, 2005.

MAULIK, Ujjwal; BANDYOPADHYAY, Sanghamitra; WANG, Jason T.. **Computational Intelligence and Pattern Analysis in Biology Informatics**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010. 372 p.

MINZ, P. S. *et al.* Algorithm for automatic calibration of color vision system in foods. **Journal Of Food Measurement And Characterization**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 1787-1794, 27 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11694-018-9794-4>.

MINZ, Prashant Saurabh *et al.* Comparison of computer vision system and colour spectrophotometer for colour measurement of mozzarella cheese. **Applied Food Research**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 1-8, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.afres.2021.100020>.

PANISSON, L. S. **Como percebemos as cores**: Aula 2, 2016. Disponível em: http://lupanisson.com.br/site/wp-content/uploads/2016/08/aula_2.pdf. Acesso em: 16 abr. 2021.

PASSETTI, Rodrigo Augusto Cortêz. **Validação do uso de fotografias para avaliação visual da carne de bovinos terminados em confinamento, com ou sem adição de óleos**

essenciais na dieta. 2016. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

PIAO, Daqing *et al.* Daily Quantification of Myoglobin Forms on Beef Longissimus Lumborum Steaks Over 7 Days of Display by Near-infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy. **Meat And Muscle Biology**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-14, 2 fev. 2022. Iowa State University. <http://dx.doi.org/10.22175/mmb.12562>.

PIRES, Fabiana de Carvalho. **Métodos instrumentais alternativos para a predição da cor do café torrado.** 2019. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

POOLE, David; MACKWORTH, Alan Keith; GOEBEL, Randy. **Computational Intelligence: A Logical Approach.** New Youk: Oxford University Press, 1998. Disponível em: <https://www.cs.ubc.ca/~poole/ci.html>. Acesso em: 30 set. 2022.

RAHMAN, Md. Faizur; IQBAL, Abdullah; HASHEM, Md. Abul; ADEDEJI, Akinbode A.. Quality Assessment of Beef Using Computer Vision Technology. **Food Science Of Animal Resources**, [S.L.], v. 40, n. 6, p. 896-907, nov. 2020. Korean Society for Food Science of Animal Resources. <http://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2020.e57>.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. D. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamento e metodologias.** Segunda edição. UFV, 2017.

Rasband, W.S., **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.

RUSSEL, Stuart; NORVIG, Peter. **Inteligência Artificial.** 3. ed. Rio de Janeiro - Rj: Ltc, 2013. 935 p.

SILVA, Hugo Guilherme Pereira da; PEREIRA, Carla Patrícia de Araújo. Cores digitais no ensino superior de design gráfico. **Design e Tecnologia**, [S.L.], v. 12, n. 25, p. 98-110, 30 dez. 2022. PGDesign / Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <http://dx.doi.org/10.23972/det2022iss25pp98-110>.

SALUEÑA, Begoña Hernández *et al.* CIELAB color paths during meat shelf life. **Meat Science**, [S.L.], v. 157, p. 107889, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107889>.

TOMASEVIC, Igor *et al.* Evaluation of poultry meat colour using computer vision system and colourimeter. **British Food Journal**, [S.L.], v. 121, n. 5, p. 1078-1087, 3 jun. 2019. Emerald. <http://dx.doi.org/10.1108/bfj-06-2018-0376>.

WU, Di *et al.* Colour measurements by computer vision for food quality control – A review. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 5-20, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2012.08.004>.

YAGIZ, Yavuz; BALABAN, Murat O; KRISTINSSON, Hordur G; A WELT, Bruce; MARSHALL, Maurice R. Comparison of Minolta colorimeter and machine vision system in measuring colour of irradiated Atlantic salmon. **Journal Of The Science Of Food And**

Agriculture, [S.L.], v. 89, n. 4, p. 728-730, 15 mar. 2009. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3467>.

PARTE DOIS - ARTIGOS

ARTIGO 1

Artigo redigido conforme a norma do periódico *British Food Journal*

“Versão Preliminar”

Cor da carne em números: compreendendo as formas químicas da mioglobina e a cor CIELAB

Meat color by numbers: understanding myoglobin redox forms and CIELAB color

Resumo

Objetivo: Este trabalho descreve as mudanças no corte contrafilé (*Longissimus lumborum*) através das proporções relativas da deoximioglobina (DMb), oximioglobina (OMb) e da metamioglobina (MMb) e dos dados colorimétricos (CIELabch) ao longo da oxigenação e oxidação do pigmento durante o armazenamento. Avaliou-se também as diferentes formas de se obter os padrões de referência das formas químicas da mioglobina e os diferentes métodos para quantificação dos pigmentos (Krzywicki e K/S).

Desenho/metodologia/abordagem: As formas químicas da mioglobina foram obtidas através do corte transversal no músculo e por indução química com ditionito de sódio 10%/1 minuto para DMb, indução química com ferricianeto de potássio 1% e por nitrito de sódio 1% para MMb, oxigenação por 30, 60 min e 24h para OMb. O *blooming* foi acompanhado por 60 minutos a 4°C com leitura a cada 10 minutos e para análise de descoloração, os bifes ficaram armazenados por 8 dias em BOD a 2°C com leituras a cada 24h. Os parâmetros L*, a*, b*, c* e h° foram obtidos via colorímetro espectrofotômetro portátil CM-700 Konika Minolta e os pigmentos foram calculados pelo método de Krzywicki e pelo método dos pontos isobésticos K/S.

Descobertas: Os parâmetros de cor e pigmentos são relacionados, mas descrevem informações diferentes, os dados de cor podem ser associados a aparência da carne, já as porções dos pigmentos, às mudanças temporais. Os métodos para predição das formas relativas da mioglobina diferem entre si, sendo o método K/S mais condizente com o esperado das transformações químicas.

Originalidade: A pesquisa demonstrou diferentes formas de se obter os padrões dos pigmentos e a forma que cada pigmento se comporta por toda vida útil da carne bovina, associando as proporções aos dados colorimétricos.

Palavras-chaves: cor da carne; pigmentos; padrões, CIELAB, CIELCH.

1 Introdução

A cor e aparência dos alimentos são os critérios mais decisivos na aceitação do consumidor, estes atributos estão associados ao frescor, amadurecimento e salubridade dos produtos (Hernández Salueña *et al.*, 2019), por este motivo, pesquisas e técnicas que envolvem alimentos podem ter o sucesso comprometido se não levarem em consideração a cor e a aparência. No caso de carnes, a cor está fortemente associada à expectativa de qualidade (Hernández *et al.*, 2016), ao passo que a intensidade da cor vermelha reduz durante o armazenamento, há uma perceptível queda nas pontuações sensoriais e nos índices de cor (Mancini and Hunt, 2005). Devido as dificuldades associadas à análise da cor por painéis sensoriais, como falta de disponibilidade de tempo, fadiga e por falta de consistência pelos painelistas, os pesquisadores frequentemente optam por medidas instrumentais da reflectância usando um colorímetro para avaliar as diferenças de tratamento, uma vez que estas são rápidas e não invasivas (Mancini *et al.*, 2022). A reflectância é uma propriedade intrínseca dos objetos que pode ser utilizada para prever tanto a cor da carne quanto as formas químicas (redox) do seu principal pigmento, a mioglobina.

As cores das carnes são, na realidade, oriundas de picos de absorção e reflexão de luz em diferentes comprimentos de onda, resultando em uma cor combinada entre os picos de luz refletida percebida pelos olhos humanos (Ramos and Gomide, 2017). Assim a cor da carne fresca é dependente do espectro de absorção e de reflexão da luz pelo pigmento, mioglobina, e que pode ser encontrada em três formas químicas básicas: deoximioglobina (DMb), onde o ferro heme se encontra reduzido (Fe^{+2}), porém sem nenhum ligante; oximioglobina (OMb), em que o ferro heme (Fe^{+2}) se liga ao oxigênio (O_2); e metamioglobina (MMb), em que o ferro heme se encontra oxidado (Fe^{+3}) (Ramos and Gomide, 2017; Mancini and Hunt, 2005). (Ramos and Gomide, 2017; Mancini and Hunt, 2005). Estes três pigmentos diferem quanto ao espectro de reflectância e, conseqüentemente, apresentam colorações distintas (vermelho púrpura, vermelho brilhante e marrom, respectivamente). Embora os três coexistam na superfície, a cor percebida é daquele que se encontra em maior proporção.

As características espectrais divergentes de cada forma química da mioglobina permitem a estimativa das respectivas proporções nas amostras a partir do espectro de reflectância em específicos comprimentos de onda (Hernández *et al.*, 2016). Dois diferentes métodos são comumente utilizados para estimar as proporções das formas químicas: 1) método matemático proposto por Krzywicki (1979), que utiliza a reflectância de comprimentos de ondas selecionados com um fator de atenuação da luz; e 2) método originalmente proposto por

(Dean and Ball, 1960), que envolve o uso da reflectância para calcular razões K/S (coeficientes de absorvidade K e de dispersão S) a partir de comprimentos de onda também selecionados. Ambos os métodos são baseados na coexistência das três formas químicas da mioglobina na superfície da carne e utilizam comprimentos de ondas específicos dos chamados pontos isobéticos, pontos em que o coeficiente de extinção milimolar de duas das formas químicas é o mesmo (Ramos and Gomide, 2017). No entanto, no método K/S os pesquisadores precisam obter valores de referência em que 100% de cada forma química da mioglobina esteja presente.

A necessidade de determinação das curvas de referência deste método permite verificar as características quantitativas e qualitativas de cada pigmento se adequando ao tipo de carne ou músculo pesquisado, aumentando a confiabilidade do método, contudo, sempre que possível, é recomendado que os pesquisadores determinem seus próprios valores-padrão ao invés de utilizar os valores da literatura, isto porque embora utilize a carne de uma mesma espécie animal, as razões de K/S variam de acordo com as condições do animal, as amostras e os equipamentos disponíveis de cada experimento (Ramos and Gomide, 2017; Hernández *et al.*, 2015).

Para isto, há várias formas de obtenção dos espectros de reflectância de referência de cada forma química da mioglobina e vários são descritos pela *American Meat Science Association* (AMSA, 2012): amostras com 100% de OMb podem ser obtidas por oxigenação rápida em atmosfera enriquecida (70 a 100%) com oxigênio; 100% de DMb podem ser obtidas pela medição de reflectância imediatamente após o corte fresco, ou pela indução química com ditionito de potássio seguido da embalagem a vácuo por 24 a 48 horas; e 100% de MMb podem ser criadas por indução química com ferricianeto de potássio por 48 h ou regulação da pressão parcial de oxigênio em ~1%. De forma alternativa, 100% MMb pode ser induzida com outros oxidantes, como o nitrito de sódio proposto por Watts *et al.* (1966) no método *Nitric oxide metmyoglobin reducing activity* (NORA) descrito por McKenna *et al.* (2005). Criar padrões de referência compostos por 100% da forma química na superfície da carne não é fácil e requer muito cuidado e esforço porque cada estado químico pode se interconverter rapidamente (AMSA, 2012).

Além da estimativa das formas químicas da mioglobina, a reflectância também pode ser utilizada para descrever a cor aparente de acordo com a luz que é emitida. O espaço CIELAB é um espaço de cores matemático criado pela *Comission Internationale de l'Éclairage* (CIE) que é frequentemente utilizado para descrever as cores dos alimentos. Segundo Ramos and Gomide (2017), o espaço CIELAB é baseado na teoria de Munsell de que a cor é tridimensional

(luminosidade, intensidade e tonalidade) e, portanto, a descreve como um sistema tridimensional Cartesiano em que a luminosidade (L^*), no eixo z , representa a claridade da amostra (0 totalmente escuras a 100 totalmente claras). Os eixos x e y são formados pelas coordenadas de cromaticidade a^* , que varia do tom de vermelho ($+a^*$) a verde ($-a^*$), e b^* , que descreve tonalidades amarelas ($+b^*$) a azuladas ($-b^*$). Além de L^* , as outras dimensões da cor prevista por Munsell são descritas vetorialmente em coordenadas polares, em uma escala conhecida como CIELCH, em que: a saturação $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$, descreve a intensidade da cor (comprimento do vetor, quanto maior C^* , mais vivida a cor); e o ângulo de tonalidade $h = \arctan(b^*/a^*)$, representa a tonalidade da amostra (ângulo do vetor em graus). Estes autores chamam a atenção ainda, para o fato de que na área de carnes as coordenadas a^* e b^* são descritas como *redness* e *yellowness*, respectivamente, o que confere uma concepção errada, uma vez que ambos não representam estas tonalidades. De forma geral, os tons oriundos da carne são descritos no primeiro quadrante ($+a^*$ e $+b^*$) no círculo trigonométrico, que varia de tons vermelhos ($h \sim 0^\circ$) a amarelos ($h \sim 90^\circ$). Assim, maiores valores de h é que indicam cores menos vermelhas ou mais amareladas.

O objetivo deste trabalho foi de avaliar as diferentes formas de se obter padrões de referência para estimativa das proporções relativas da DMb, OMb e MMb pelo método K/S e sua relação com os dados colorimétricos (CIELAB e CIELCH). Objetivou-se também acompanhar as mudanças na proporção dos pigmentos e cor da CIE durante o processo de oxigenação (*blooming*) e oxidação do pigmento durante o armazenamento refrigerado.

2 Material e métodos

2.1 Matéria-prima

Foram utilizados contrafilés (*M. Longissimus lumborum*; pH = $5,56 \pm 0,06$) bovinos de 10 diferentes animais, obtidos 48 h *post-mortem* no comércio local de Lavras, MG, Brasil. De cada contrafilé, foram retirados bifes de aproximadamente 2,5 cm de espessura, para que atendesse o princípio da refletividade (Girolami *et al.*, 2013), e destinados à avaliação da oxigenação (*blooming*), determinação dos padrões de referência e acompanhamento da descoloração durante o tempo de estocagem refrigerada.

2.2 Avaliação durante a oxigenação

Quatro bifés de 2,5 cm de espessura de cada contrafilé foram obtidos com ajuda de um molde e destinados à avaliação durante a oxigenação (*blooming*). Imediatamente após cada corte, uma leitura de cor foi feita na superfície recém exposta visando obter a curva de reflectância para 100% deoximioglobina (DMb). Esta leitura foi feita por um único “disparo”, devido à dificuldade de se manter 100% de DMb quando o pigmento é exposto ao ar atmosférico (AMSA, 2012). Após obtenção dos bifés, estes foram individualmente acondicionados em bandejas de isopor, embalados com filme de policloreto de vinila (PVC) altamente permeável ao oxigênio (taxa de transmissão de oxigênio de 6000–8000 cm³/m².dia a 25 °C e 760 mmHg), sem que tocasse a superfície do bife, e armazenados a 4 °C para avaliação da oxigenação conduzida a leitura de cor a cada 10 min, pelo tempo máximo de 60 min. A partir do tempo de 10 min, as leituras foram conduzidas com cinco disparos nas superfícies dos bifés já expostas anteriormente ao oxigênio. O filme de PVC foi retirado e colocado novamente após cada leitura com o colorímetro. A média das coordenadas de cor e das leituras de reflectância obtidas nos quatro bifés (replicatas) foram obtidas para cada contrafilé (repetição) e utilizadas na análise estatística.

2.3 Avaliação durante o armazenamento refrigerado

Após oxigenação, uma bandeja contendo um bife de cada contrafilé foi armazenado a 2 °C em câmara climática (model EL202; EletroLab, São Paulo, SP, Brazil), ao abrigo da luz, para a avaliação da estabilidade da cor. A cor dos bifés foi avaliada a cada 24 h, por um período de 8 dias. O filme de PVC foi retirado e colocado novamente após cada leitura com o colorímetro.

2.4 Obtenção dos padrões de referência

Após avaliação da oxigenação, os espectros de reflectância de referência de cada forma química de mioglobina foram obtidos por diferentes procedimentos.

A obtenção do padrão de 100% de deoximioglobina (DMb) foi feita por dois métodos descritos pela AMSA (2012): 1) método direto (Bloom-0), obtido imediatamente na superfície recém-cortada dos bifés de 2,5cm durante a avaliação da oxigenação, sendo considerando a média dos quatro bifés; e 2) método induzido quimicamente (Ditionito), em que um bife de 2,5 cm de espessura foi submerso em solução de ditionito de sódio (Na₂S₂O₄) 10% durante 1 min, seco com papel toalha, embalado à vácuo e mantido a 4 °C por 96 h, sendo a leitura de cor

realizada nos tempos 0, 15 min e nas 24, 48, 72 e 96 h seguintes, em cada momento, foi aberto o vácuo para a leitura sem a embalagem e refeito até a próxima leitura.

O padrão de 100% de metamioglobina (MMb) também foi obtido por dois métodos de indução química utilizando 1) ferricianeto de potássio [$K_3Fe(CN)_6$] (Ferricianeto) e 2) nitrito de sódio ($NaNO_2$) (Nitrito) como agentes oxidantes e seguindo os procedimentos descritos por AMSA (2012). Em cada método, um bife de 2,5 cm de espessura foi submerso em solução oxidante 1% durante 1 min, seco com papel toalha, coberto com plástico de polietileno de alta densidade (PEAD) e mantido a 4 °C por 96 h, sendo a leitura de cor realizada nos tempos 0 (imediatamente após imersão/secagem), 15 min e nas 24, 48, 72 e 96 h seguintes.

A obtenção do padrão de oximioglobina (OMb) sugerido pela literatura é através do acondicionamento da carne em de uma atmosfera modificada contendo de 70 a 100% de O_2 , armazenado em baixas temperaturas e, pelo menos, por 12 h para ocorrer a difusão do oxigênio na superfície da carne (AMSA, 2012). Porém, obter o pigmento nestas condições não é uma realidade de diversos centros de pesquisa. Como alternativa, admite-se a carne oxigenar através do oxigênio presente no ar atmosférico. Trabalhos publicados indicam que a partir de 30 min de oxigenação já seria o suficiente para ver as mudanças na superfície da carne, mas a formação de OMb é continuada por até 24 h (Lindahl *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008a). Partindo deste princípio, três padrões de 100% de OMb, foram obtidas nas amostras oxigenadas embaladas e mantidas (a 2 °C) por 30 e 60 min e após um dia de armazenamento. A escolha de um padrão oxigenado após 24 h se baseia no fato da carne com um dia de exposição possuir um tom mais avermelhado e vívido do que no primeiro dia, já que o oxigênio está mais difundido/penetrado na superfície da carne (Lindahl, 2011).

2.5 Avaliação instrumental da cor

As leituras de cor instrumental foram realizadas utilizando um colorímetro espectrofotômetro portátil CM-700 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japão), com porta de abertura com Φ 8 mm (MAV), iluminante A, ângulo do observador 10° e nos modos de componente especular incluído (SCI) e excluído (SCE) em cinco pontos representativos, exceto para o tratamento Bloom-0, em que foi feito um único disparo sobre a superfície cárnea. As coordenadas luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*), índice de amarelo (b^*), ângulo de tonalidade (h, graus) e saturação (C^*) foram obtidos, assim como os dados de reflectância da superfície da carne coletados de 400 a 710 nm, com um intervalo de 10 nm. Antes das leituras, o colorímetro foi calibrado conforme instruções do fabricante.

Os dados obtidos no modo SCI foram usados nos cálculos da proporção de formas químicas de mioglobina, para eliminar quaisquer interferências da dispersão da luz pelas diferenças da matriz cárnea, enquanto os dados obtidos no modo SCE foram usados na descrição da cor pelo sistema CIELAB e CIELCH, por estar relacionado à percepção sensorial (Ramos and Gomide, 2017).

2.5.1 Cálculo das formas químicas da mioglobina pelo método K/S

O método de K/S é baseado no uso dos pontos isobésticos, em que o coeficiente de extinção milimolar (ϵ) é igual para duas formas químicas da mioglobina. Assim, são utilizados os comprimentos de onda 474nm (ϵ igual para MMb e OMb), 525nm (ϵ igual para todas as três formas químicas), 572nm (ϵ igual para OMb e DMb) e 610nm (ϵ igual para MMb e DMb) (AMSA, 2012). Como a reflectância foi medida em intervalos de 10 nm, os valores intermediários foram calculados por interpolação linear.

Os pigmentos heme da carne estão envolvidos por uma matriz de sólidos, que pode ser considerada um meio espectral não-seletivo, com um coeficiente de dispersão (S), dependente do comprimento de onda (λ). Os pigmentos heme, por sua vez, absorvem luz seletivamente e têm um coeficiente de absorção (K). Dessa forma, a razão K/S torna-se crítica. Se a matriz da carne apresentar elevados valores de S, ou seja, causar grandes dispersões na luz incidente, o efeito da concentração de pigmentos heme, K, será mascarado (Ramos and Gomide, 2017). Assim, as reflectâncias obtidas nos pontos isobésticos foram convertidas em valores de K/S usando a equação de Kubelka-Munk (Eq.1) para separar a contribuição relativa da absorção do pigmento e da dispersão do meio que o rodeia, corrigindo o problema da reflectância não apresentar comportamento linear com a concentração de pigmentos (AMSA, 2012).

$$K/S = \frac{(1-R)^2}{2R} \quad (1)$$

em que R é a reflectância de determinado comprimento de onda expressa em decimal.

Para cada ponto isobéstico, o valor de K/S foi dividido pelo valor de K/S a 525nm para reduzir erros decorrentes das variações quanto à quantidade de pigmentos presentes (Stewart *et al.*, 1965). Estes valores foram utilizados para avaliar a proporção relativa de cada pigmento nas amostras, ao serem colocados em equações (Eq. 2, 3 e 4) juntamente com os valores de

referência para 100% das três formas químicas da mioglobina (AMSA, 2012) e que foram obtidas no item 2.4.

$$\%MMb = \frac{\left(\frac{K/S\ 572}{K/S\ 525}\right)_{100\% DMb} - \left(\frac{K/S\ 572}{K/S\ 525}\right)_{amostra}}{\left(\frac{K/S\ 572}{K/S\ 525}\right)_{100\% DMb} - \left(\frac{K/S\ 572}{K/S\ 525}\right)_{100\% MMb}} \times 100 \quad (2)$$

$$\%DMb = \frac{\left(\frac{K/S\ 474}{K/S\ 525}\right)_{100\% MMb} - \left(\frac{K/S\ 474}{K/S\ 525}\right)_{amostra}}{\left(\frac{K/S\ 474}{K/S\ 525}\right)_{100\% MMb} - \left(\frac{K/S\ 474}{K/S\ 525}\right)_{100\% DMb}} \times 100 \quad (3)$$

$$\%OMb = \frac{\left(\frac{K/S\ 610}{K/S\ 525}\right)_{100\% MMb} - \left(\frac{K/S\ 610}{K/S\ 525}\right)_{amostra}}{\left(\frac{K/S\ 610}{K/S\ 525}\right)_{100\% MMb} - \left(\frac{K/S\ 610}{K/S\ 525}\right)_{100\% OMb}} \times 100 \quad (4)$$

2.5.2 Cálculo das formas químicas da mioglobina pelo método de Krzywicki

No segundo método, proposto por Krzywicki (1979), não é necessário a conversão de 100% dos pigmentos, a DMb e a MMb são determinadas por fórmulas matemáticas baseadas na lei de Lambert-Beer e na extinção molar de cada forma química, sendo a OMb calculada indiretamente pela diferença da combinação das porcentagens de 100%.

O método é baseado no conceito de atenuação da luz (A), utilizando a reflectância a 525 nm como denominador na razão dos pontos isobésticos nos comprimentos de onda 473 (para cálculo da DMb), e 572 (para cálculo da MMb). A reflectância entre 700 e 730nm também é usada como ponto atenuante da luz refletida, conferido pela carne livre de pigmentos, uma vez que nestes comprimentos de onda cada espectro de absorvância dos pigmentos da carne apresenta valor de coeficiente de extinção molar mínimo, não dependente da concentração de pigmentos (Ramos and Gomide, 2017).

Assim, os valores de reflectância de cada comprimento de onda obtidos nas amostras foram convertidos para A (Eq. 5) e a proporção das formas DMb, MMb e OMb calculados pelas equações 6, 7 e 8, respectivamente.

$$A = \log\left(\frac{1}{R}\right) \quad (5)$$

$$\%DMb = 2,375 \times \left(1 - \frac{A^{473} - A^{710}}{A^{525} - A^{710}}\right) \quad (6)$$

$$\%MMb = 1,395 - \left(\frac{A^{572} - A^{710}}{A^{525} - A^{710}}\right) \quad (7)$$

$$\%OMb = 100 - (\%MMb + \%DMb) \quad (8)$$

em que A é o índice de atenuação da luz e R é a reflectância de determinado comprimento de onda expressa em decimal.

2.6 Análise estatística

Para definição dos padrões de referência, o experimento foi disposto em um delineamento de bloco casualizados (DBC), considerando cada animal (10 repetições) um bloco. Os dados dos padrões de MMb foram avaliados em esquema fatorial 2 (tipo de oxidante) \times 6 (tempos para leitura) e os tratamentos dos demais padrões (DMb e OMb) diretamente avaliados por análise de variância (ANOVA). As proporções das formas químicas, via método K/S e Krzywicki, e os dados de CIE cor das amostras foram avaliados em esquema fatorial 2 (método) \times 7 (tempos) para o experimento de oxigenação e 2 (método) \times 9 (tempos) para o experimento de armazenamento e submetidos à ANOVA.

As análises foram conduzidas utilizando o pacote estatístico SAS, versão 9.2 (Statistical Analysis System - SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), considerando nível de significância de 5%, e quando necessário as médias foram separadas pelo teste de alcance múltiplo de Duncan ($P < 0,05$).

3. Resultados e discussão

3.1 Determinação dos padrões de referência

3.1.1 Padrão de metamioglobina

Os efeitos dos tratamentos com os oxidantes ferricianeto de potássio e nitrito de sódio na proporção das formas químicas da mioglobina e dos valores K/S dos pontos isobécticos na superfície das carnes são representados na Tabela 1.

Tabela 1. Efeitos do tipo e tempo após exposição (a 4°C) aos oxidantes nas proporções das formas químicas da mioglobina¹ e das razões K/S na superfície de contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos.

Efeitos	Fonte de Variação	Forma química (%) ¹			Razão K/S		
		MMb	DMb	OMb	572/525	474/525	610/525
Oxidante, O	Ferricianeto	63,84	16,44	19,73	0,73	0,92 ^x	0,58 ^x
	Nitrito	53,35	18,46	28,20	0,83	0,90 ^y	0,60 ^y
Tempo, T	0	47,41	20,64 ^a	31,95	0,91	0,90	0,56 ^a
	15 min	51,65	20,84 ^a	27,52	0,86	0,90	0,59 ^b
	1 dia	61,82	15,60 ^b	22,58	0,74	0,92	0,59 ^b
	2 dias	63,12	15,97 ^b	20,91	0,72	0,91	0,60 ^b
	3 dias	63,90	15,37 ^b	20,74	0,71	0,91	0,59 ^b
	4 dias	63,66	16,27 ^b	20,07	0,72	0,91	0,60 ^b
	EPM	1,24	0,74	1,08	0,014	0,003	0,005
<i>Pr < F²</i>							
	O	<0,001	0,058	<0,001	<0,001	0,001	0,006
	T	<0,001	0,003	<0,001	<0,001	0,110	0,024
	O × T	0,048	0,998	0,045	0,048	0,987	0,307

MMb = metamioglobina; DMb = deoximioglobina; OMb = oximioglobina; e EPM = erro padrão da média (n = 120).

¹ Obtida pelo método de Krzywicki (1979).

² Probabilidades significativas (P < 0,05) foram destacadas em negrito.

^{x,y} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem (P < 0,05) pelo teste F.

^{a,b} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem (P < 0,05) pelo teste de Duncan.

A proporção de MMb, assim como a razão K/S 572/525, foram afetadas pela interação oxidante x tempo de estabilização, sendo esta decomposta e descrita na Tabela 2. Para o oxidante ferricianeto, o tempo necessário para a estabilização da formação de MMb foi de um

dia, não havendo mais alteração significativa na sua proporção ao decorrer dos dias de exposição. Já para o nitrito, a estabilização apenas ocorreu a partir do terceiro dia, embora os valores não tenham sido estatisticamente diferentes das amostras expostas por um dia. Além de conferir uma maior taxa de formação de MMb, a razão K/S 572/525 também ficou estável após 24 h nas amostras tratadas com ferricianeto, enquanto nas amostras tratadas por nitrito a estabilização ocorreu apenas a partir do segundo dia. Estas diferenças também podem ser observadas pelas mudanças na curva espectral dos pigmentos oxidados (Figura 1).

Tabela 2. Efeitos da interação oxidante x tempo de estabilização nas proporções¹ de metamioglobina (MMb) e oximioglobina (Omb) e da razão K/S 572/525 na superfície de contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos.

Oxidante	Tempo	Forma químicas (%) ¹		Razão K/S
		MMb	Omb	572/525
Ferricianeto	0	47,30 ^a	33,17 ^a	0,92 ^a
	15 min	55,50 ^{ab}	24,59 ^a	0,82 ^{bd}
	1 dia	69,62 ^c	16,16 ^b	0,66 ^c
	2 dias	70,19 ^c	14,79 ^b	0,66 ^c
	3 dias	70,76 ^c	15,06 ^b	0,64 ^c
	4 dias	69,65 ^c	14,59 ^b	0,66 ^c
	EPM	1,79	1,68	0,020
Nitrito	0	47,51 ^a	30,73 ^a	0,90 ^{ab}
	15 min	47,80 ^a	30,44 ^a	0,90 ^{ab}
	1 dia	54,02 ^{ab}	28,99 ^a	0,82 ^b
	2 dias	56,06 ^{ab}	27,04 ^a	0,79 ^d
	3 dias	57,03 ^b	26,42 ^a	0,78 ^d
	4 dias	57,66 ^b	25,56 ^a	0,77 ^d
	EPM	1,29	1,02	0,015

EPM = erro padrão da média (n = 60).

¹ Obtida pelo método de Krzywicki (1979).

^{a-d} Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem (P < 0,05) pelo teste de Duncan.

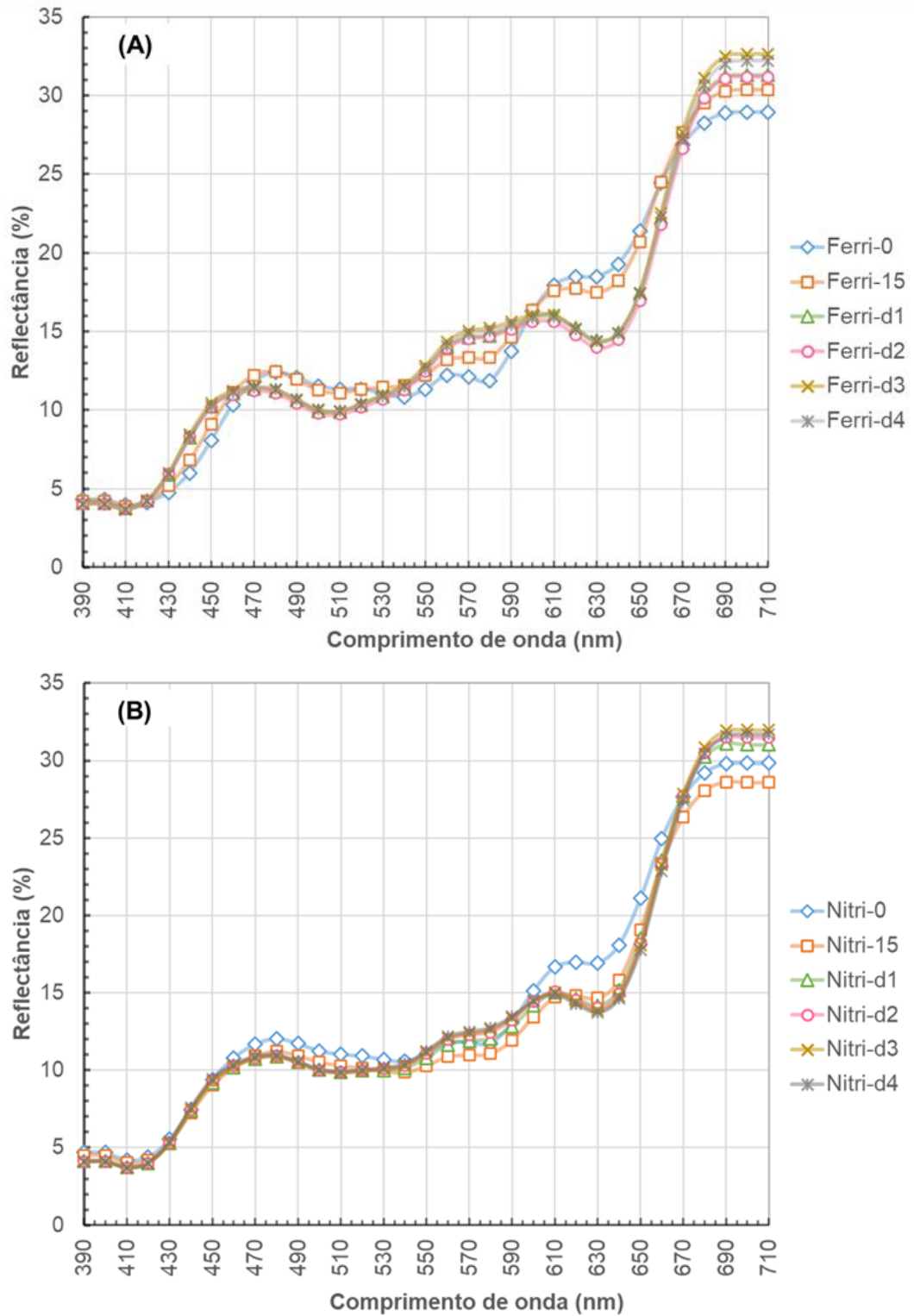


Figura 1. Espectro de refletância de amostras de contrafilés (*M. L. lumorum*) bovinos tratadas com (A) ferricianeto de potássio 1% e (B) nitrito de sódio 1% e mantidas estocadas (4 °C) por 0, 15 min e por 4 dias (d1 a d4).

O nitrito de sódio atua como oxidante da mioglobina, com a reação inicial consistindo na conversão da DMb e/ou Omb em MMb (AMSA, 2012). Watts *et al.* (1966) propuseram o uso do nitrito como agente de oxidação ao invés do ferricianeto na análise de atividade redutora da MMb (MRA), visto que o ferricianeto além de complexar com a mioglobina, facilita a transferência de elétrons, interferindo na reação de redução (Wu *et al.*, 2020; Denzer *et al.*, 2019). Em ambos os casos, a adição do agente oxidante na superfície pode não corresponder exatamente ao mecanismo da formação natural da MMb. Segundo Sammel *et al.* (2002), a vantagem da utilização do nitrito como agente oxidante seria a alta correlação com a estabilidade da cor de carne e a percepção sensorial da cor amarronzada gerada pela oxidação com nitrito.

No entanto, pelo método matemático de Krzywicki, o nitrito induz uma menor proporção de MMb comparado ao ferricianeto. Isto pode ser devido à dificuldade em se ter a completa oxidação dos pigmentos nas camadas internas da carne, o que é alcançado após 1 dia da exposição ao oxidante, no caso do ferricianeto (tanto da proporção de MMb quanto do K/S 572/525). No caso do nitrito, o maior tempo para estabilização pode estar associado à sua conversão ao gás oxido nítrico (NO), que interage com a mioglobina formando o pigmento nitrosomioglobina (NOMb), de cor vermelho rosado (Honikel, 2008). Segundo Girolami *et al.* (2013) a luz do colorímetro penetra cerca de 1,5 a 2,0 cm de profundidade na carne. Desta forma, a leitura de espectro feita na superfície da carne também contém leituras das camadas inferiores (Figura 2), medindo não apenas a MMb formada, mas também a NOMb, um quarto pigmento. Isto explica a menor proporção de MMb calculada pelo método de Krzywicki. Da mesma forma, a oxidação pelo ferricianeto também pode não ter alcançado totalmente as camadas inferiores e, assim, o espectro formado pode conter pigmentos de DMb, especialmente devido à alta MRA das carnes que estavam frescas (48 h *post-mortem*), acredita-se que a atividade das enzimas redutoras dependente de NADH presentes no músculo podem reduzir a forma férrica da MMb à forma ferrosa da DMb, e a descoloração da carne durante o armazenamento tem sido atribuída a perda desse sistema, pois tanto a atividade enzimática quanto a disponibilidade de NADH diminuem ao decorrer do tempo (Cardoso *et al.*, 2019; Mancini and Hunt, 2005; McKenna *et al.*, 2005).

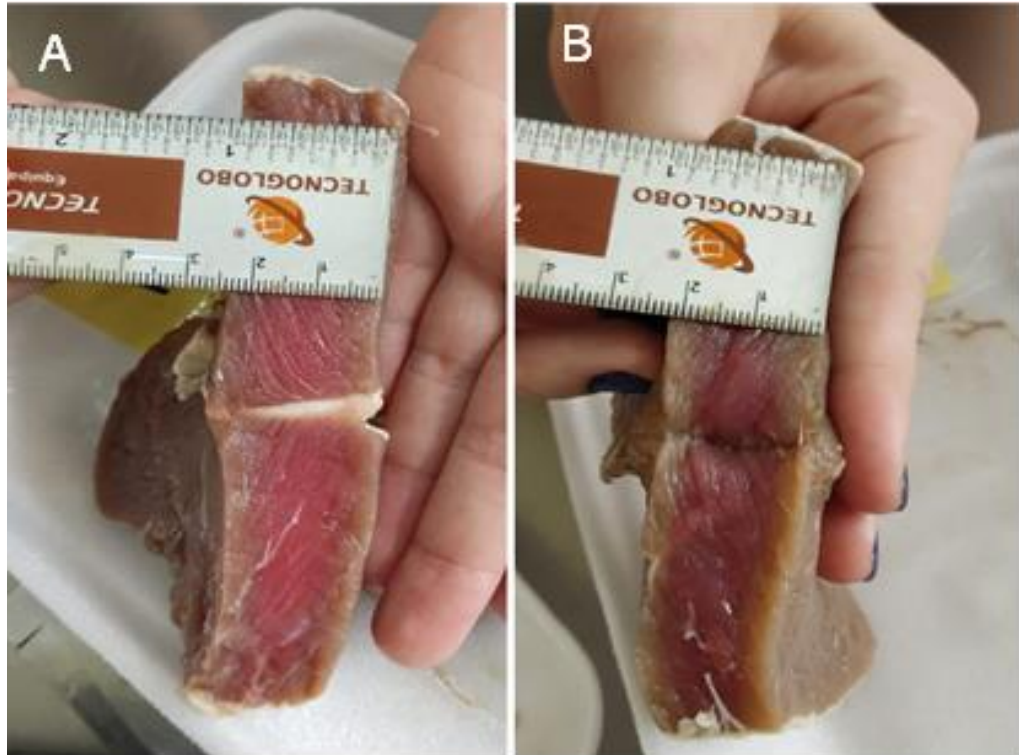


Figura 2. Fotografia ilustrando o interior dos bifes padrões de MMb após quatro dias de armazenamento (4 °C) depois de expostos aos oxidantes (A) nitrito e (B) ferricianeto.

As diferenças na proporção de MMb formada com o uso dos dois agentes oxidantes também refletiu na cor analisada (Tabela 3). Apesar de não haver nenhuma interação significativa, o uso de nitrito gerou ($P < 0,05$) uma cor marrom mais escura (menor L^*), menos intensa (menor C^*) e com matiz mais vermelha (menor h) do que as amostras oxidadas pelo ferricianeto. Maiores valores de h e de C^* nas amostras tratadas com ferricianeto são condizentes com a maior proporção de MMb calculada pelo método de Krzywicki, uma vez que Aroeira *et al.* (2017) relataram uma alta correlação positiva e uma correlação negativa baixa, porém significativa, entre os valores de h ($r = 0,70$) e C^* ($r = -0,23$) e a proporção de MMb na superfície de carnes bovinas.

Tabela 3. Efeitos do tipo e tempo após exposição (a 4°C) aos oxidantes nos índices de cor na superfície de contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos.

Efeitos	Fonte de Variação	L*	a*	b*	C*	h (°)
Oxidante, O	Ferricianeto	43,93 ^x	8,45 ^x	12,49 ^x	15,12 ^x	56,21 ^x
	Nitrito	42,30 ^y	9,12 ^y	10,92 ^y	13,53 ^y	48,03 ^y
Tempo, T	0	43,27	10,55 ^a	12,15	16,16 ^a	48,67
	15 min	43,16	9,22 ^b	11,45	14,78 ^{ab}	50,72
	1 dia	42,88	8,40 ^b	11,38	14,23 ^{ab}	53,50
	2 dias	42,74	8,02 ^b	11,22	13,85 ^b	54,24
	3 dias	43,06	8,01 ^b	11,47	14,04 ^b	54,92
	4 dias	43,60	8,49 ^b	12,56	12,90 ^b	50,68
	EPM	0,35	0,22	0,33	0,32	0,90
Pr < F¹	O	0,002	0,076	0,006	0,006	<0,001
	T	0,945	0,001	0,700	0,037	0,179
	O × T	0,885	0,205	0,239	0,400	0,715

L*= luminosidade; a*= índice de vermelho; b*= índice de amarelo; C*= saturação; h = tonalidade; EPM = erro padrão da média (n = 120).

¹ Probabilidades significativas (P < 0,05) foram destacadas em negrito.

^{x,y} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem (P < 0,05) pelo teste F.

^{a,b} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem (P < 0,05) pelo teste de Duncan.

3.1.2 Padrão de deoximioglobina

A proporção das formas químicas da mioglobina e os valores K/S dos pontos isobéticos das amostras foram todos afetados (P<0,05) pelo tratamento (Tabela 4). A maior proporção de DMb foi observada nas amostras recém cortadas (Bloom-0), mas que estatisticamente não diferiram (P > 0,05) das amostras tratadas com ditionito de sódio, embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C por um dia (Ditio-d1). Isto condiz com a recomendação da AMSA (2012) de que na obtenção de 100% DMb utilizando ditionito, deve-se armazenar as amostras embaladas a vácuo por 24h para a difusão do reagente químico e a estabilização da DMb. No entanto, apesar das proporções de DMb obtidas pelo método de Krzywicki serem iguais, os valores K/S 474/525 para estes tratamentos diferiram (P < 0,05), o que indica uma diferença na proporção de DMb e que pode ser observada nas curvas de reflectância (Figura 3).

Tabela 4. Efeitos dos tratamentos¹ nas proporções das formas química da mioglobina² e das razões K/S na superfície de contrafilés (*M. L. lumorum*) bovinos

Tratamento	Forma química (%)			Razão K/S		
	MMb	DMb	OMb	572/525	474/525	610/525
Bloom-0	10,53 ^a	84,46 ^a	5,00 ^a	1,42 ^a	0,63 ^a	0,46 ^a
Ditionito-0	15,85 ^{ab}	35,89 ^b	48,26 ^b	1,32 ^b	0,83 ^{bc}	0,44 ^a
Ditionito-15	22,27 ^b	27,83 ^b	49,90 ^b	1,23 ^c	0,87 ^b	0,44 ^a
Ditionito-d1	12,35 ^a	73,40 ^{ac}	14,25 ^{ac}	1,32 ^b	0,72 ^d	0,55 ^b
Ditionito-d2	14,11 ^a	64,17 ^{cd}	21,72 ^{ac}	1,33 ^b	0,73 ^d	0,52 ^b
Ditionito-d3	14,10 ^a	65,94 ^{cd}	19,96 ^{ac}	1,32 ^b	0,73 ^d	0,54 ^b
Ditionito-d4	15,32 ^a	52,93 ^d	31,75 ^c	1,30 ^{bc}	0,78 ^{cd}	0,54 ^b
EPM	1,06	4,49	3,83	0,013	0,017	0,012
<i>Pr</i> < <i>F</i>³	0,035	<0,001	<0,001	0,019	<0,001	<0,001

MMb = metamioglobina; DMb = deoximioglobina; OMb = oximioglobina; e EPM = erro padrão da média (n = 70).

¹ Bloom-0 = leitura imediatamente após corte; e Ditionito = imersão em ditionito de sódio 10% por 1 min + embalagem à vácuo e leitura após 0 e 15 min e 1, 2, 3 e 4 dias (d).

² Obtida pelo método de Krzywicki (1979).

³ Probabilidades significativas ($P < 0,05$) foram destacadas em negrito.

^{a-d} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

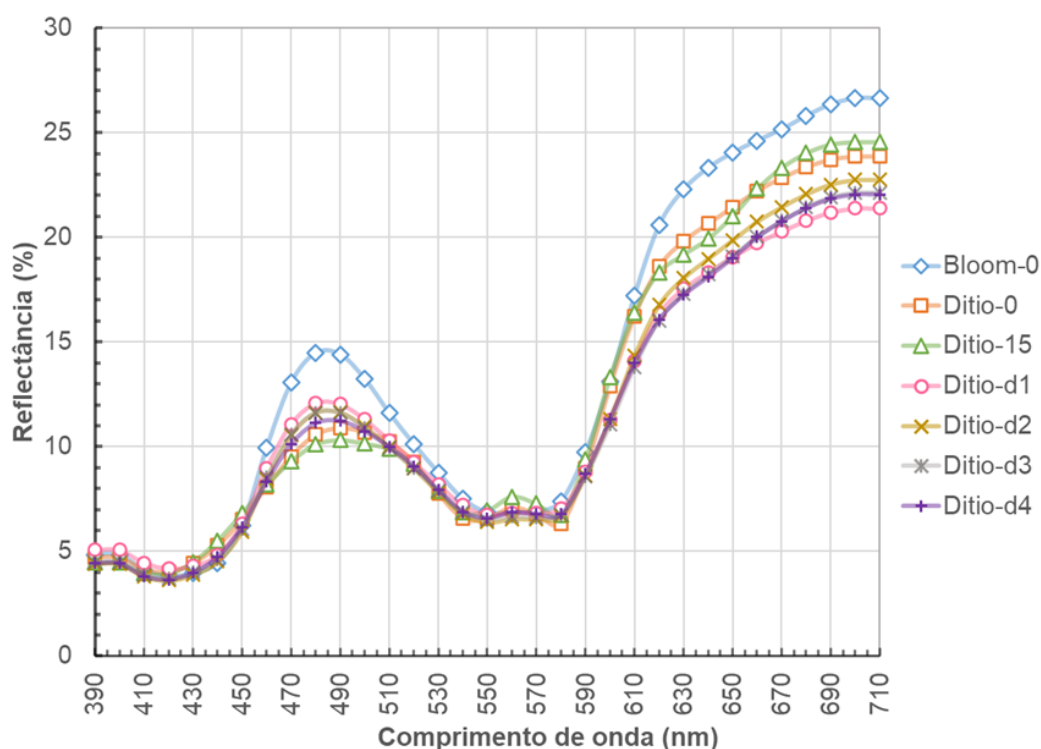


Figura 3. Espectro de reflectância de amostras de contrafilés (*M. L. lumorum*) bovinos em diferentes tratamentos: Bloom-0 = leitura imediatamente após corte; e ditio = imersão em ditionito de sódio; 10%/10% por 1 min + embalagem à vácuo e leitura após 0 e 15 min e 1, 2, 3 e 4 dias (d).

Analisando as curvas do espectro de reflectância, pode-se observar que apesar de terem o mesmo comportamento, o padrão de DMb obtido na amostra recém cortada tem uma maior reflectância na região do azul (470-490 nm), o que condiz com uma tonalidade de vermelho mais púrpura, característica da DMb. Da mesma forma, pode-se observar que nas curvas da DMb obtidas com maiores tempos de estabilização do ditonito, há um aumento da reflectância nesta região e uma concomitante redução na região do vermelho (>610 nm). Vale ainda ressaltar que, embora o pigmento induzido quimicamente pelo ditonito + vácuo permaneça estável até o terceiro dia de armazenamento, nota-se um decréscimo no conteúdo de DMb e tendência de aumento nos valores de K/S 474/525 (Tabela 3), que indicam uma possível alteração na proporção deste pigmento nas amostras.

Com relação à cor instrumental apenas os valores de L^* não foram afetados ($P > 0,05$) pelos tratamentos (Tabela 5), tendo média de $38,05 \pm 2,77$. A tonalidade da cor das amostras recém cortadas era semelhante às amostras tratadas com ditonito após 1 dia de estabilização, diferindo apenas na intensidade desta cor (maiores valores de C^*).

Tabela 5. Efeito dos tratamentos¹ nos índices de cor na superfície de contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos.

Tratamento	L^*	a^*	b^*	C^*	h (°)
Bloom-0	40,15	16,85 ^a	8,26 ^a	18,78 ^{ab}	23,08 ^a
Ditonito-0	38,48	17,12 ^a	9,97 ^{bc}	19,83 ^a	30,03 ^b
Ditonito-15	38,53	16,88 ^a	10,74 ^c	20,01 ^a	32,38 ^b
Ditonito-d1	37,27	13,62 ^b	7,24 ^a	15,44 ^c	27,77 ^{ba}
Ditonito-d2	37,10	14,87 ^b	8,26 ^a	17,01 ^{bc}	29,08 ^{ba}
Ditonito-d3	36,66	13,97 ^b	7,72 ^a	15,98 ^c	28,86 ^{ba}
Ditonito-d4	36,58	14,10 ^b	8,66 ^{ab}	16,57 ^c	31,69 ^b
EPM	0,50	0,45	0,33	0,54	0,97
$Pr < F^2$	0,387	0,003	<0,001	0,001	0,007

L^* = luminosidade; a^* = índice de vermelho; b^* = índice de amarelo; C^* = saturação;

h° = tonalidade; EPM = erro padrão da média ($n = 70$).

¹ Bloom-0 = leitura imediatamente após corte; e Ditonito = imersão em ditonito de sódio 10% por 1 min + embalagem à vácuo e leitura após 0 e 15 min e 1, 2, 3 e 4 dias (d). ² Probabilidades significativas ($P < 0,05$) foram destacadas em negrito.

^{a,b} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

3.1.3 Padrão de oximioglobina

Todas as formas químicas da mioglobina e os valores K/S dos pontos isobéticos das amostras foram afetadas significativamente pelo tempo de oxigenação (Tabela 6). De forma geral, a proporção de OMb nas amostras oxigenadas por 30 min era igual às oxigenadas por 60 min, porém inferior às amostras oxigenadas por um dia. Isto ocorre porque a profundidade da camada oxigenada é dependente de um equilíbrio entre a concentração de oxigênio na superfície e a respiração mitocondrial residual do músculo *post mortem* (taxa de consumo de oxigênio; TCO), que se torna menos competitiva ao decorrer do tempo, como resultado da depleção dos substratos, coenzimas e da degradação das enzimas envolvidas (Cardoso *et al.*, 2019; McKenna *et al.*, 2005). A utilização de uma baixa temperatura (4°C) de oxigenação também favorece a solubilidade do oxigênio, por reduzir a atividade mitocondrial da carne (Ledward, 1992), aumentando a penetração na carne. Jose and McGilchrist (2022) demonstraram um aumento de aproximadamente 2 mm de profundidade de penetração do oxigênio após 24 h de oxigenação de amostras de *L. lumbrorum* bovinos com 5 dias *post mortem* quando comparado com a oxigenação por 1 h. Já para carnes com 40 dias *post mortem*, a diferença foi ainda mais expressiva, sendo de aproximadamente 3 mm de profundidade em oxigenação 1 h para quase 6 mm de profundidade após 24 h.

Tabela 6. Efeitos dos tempos de oxigenação (30 e 60 min e 1 dia) nas proporções das formas químicas da mioglobina¹ e das razões K/S na superfície de contrafilés (*M. L. lumbrorum*) bovinos.

Tratamento	Forma químicas (%) ¹			Razão K/S		
	MMb	DMb	OMb	572/525	474/525	610/525
Bloom-30	11,09 ^a	22,02 ^a	66,88 ^a	1,43 ^a	0,89 ^a	0,35 ^a
Bloom-60	11,62 ^a	19,41 ^a	68,98 ^{ab}	1,42 ^a	0,90 ^a	0,35 ^a
Bloom-d1	17,39 ^b	10,40 ^b	72,21 ^b	1,36 ^b	0,94 ^b	0,28 ^b
EPM	0,82	1,81	1,50	0,009	0,008	0,012
<i>Pr < F</i>²	<0,001	0,002	0,047	<0,001	0,002	<0,001

MMb = metamioglobina; DMb = deoximioglobina; OMb = oximioglobina; e EPM = erro padrão da média (n = 30).

¹ Obtida pelo método de Krzywicki (1979).

² Probabilidades significativas (P < 0,05) foram destacadas em negrito.

^{a-b} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem (P < 0,05) pelo teste de Tukey.

Os índices de cor também foram coerentes com a formação de OMb, com as amostras após um dia de armazenamento tendo a mesma luminosidade e tonalidade do que as amostras

oxigenadas por 60 min, porém estas amostras apresentaram maior intensidade de cor (maiores valores de C*) (Tabela 7). Com uma maior profundidade do oxigênio e aumento da proporção da OMb, a cor da carne ficou mais vívida, com mudanças dos índices a* e b* refletido nos valores de C*, um parâmetro responsivo para a oxigenação e altamente correlacionado com a OMb (Aroeira *et al.*, 2017). Entretanto, embora a proporção de OMb nas amostras oxigenadas por 60 min fosse igual ($P > 0,05$) às amostras oxigenadas por um dia, os valores de K/S 610/525 eram significativamente diferentes. Além disso, o maior tempo de armazenamento parece ser suficiente para que o pigmento sofresse um início de oxidação, evidenciado na curva de reflectância (Figura 4) em que se observa uma depressão na região do vermelho (entre 630 e 640 nm), podendo interferir nos resultados ao utilizá-lo como padrão.

Tabela 7. Efeito do tempo de oxigenação (30 e 60 min e 1 dia) nos índices de cor da superfície de contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos.

Tratamento¹	L*	a*	b*	C*	h (°)
Bloom-30	41,76	21,00 ^a	13,88 ^a	25,19 ^a	33,22 ^a
Bloom-60	42,38	21,40 ^a	14,38 ^a	25,80 ^a	33,62 ^{ab}
Bloom-d1	40,80	23,32 ^b	15,94 ^b	28,25 ^b	34,25 ^b
EPM	0,69	0,49	0,49	0,67	0,34
Pr < F¹	0,264	<0,001	<0,001	<0,001	0,018

L* = luminosidade; a* = índice de vermelho; b* = índice de amarelo; C* = saturação;

h° = tonalidade; EPM = erro padrão da média (n = 30).

¹ Probabilidades significativas ($P < 0,05$) foram destacadas em negrito.

^{a,b} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

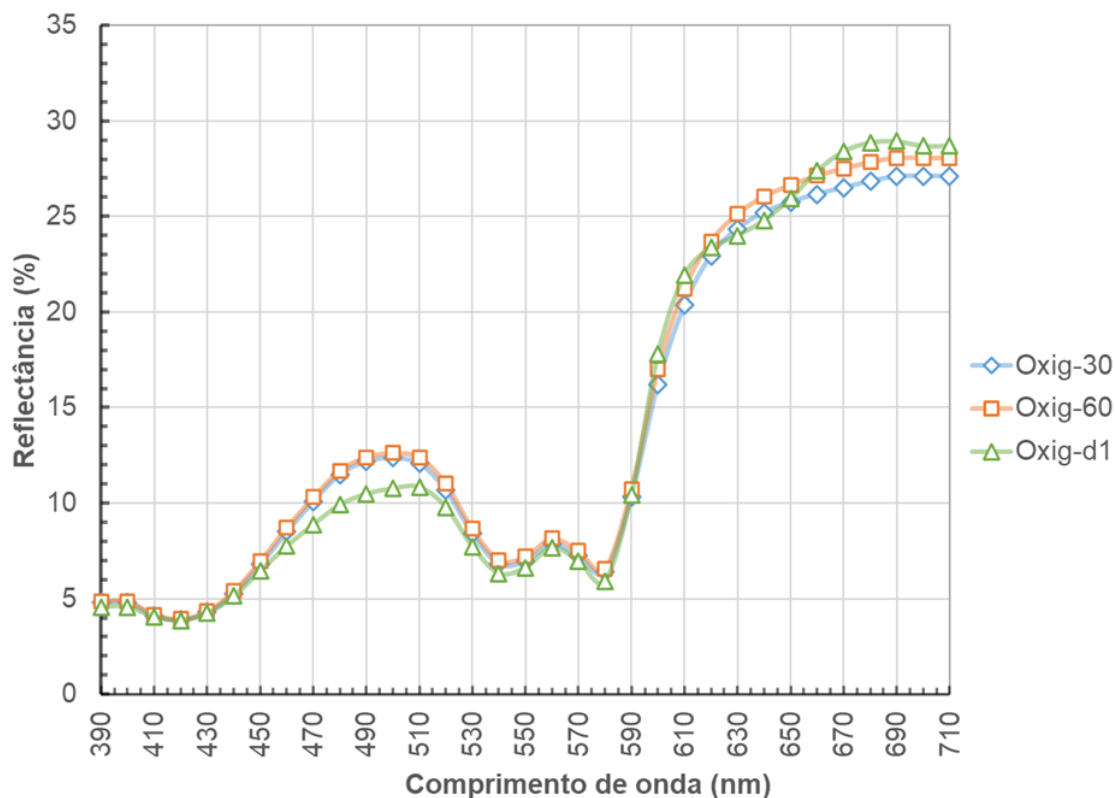


Figura 4. Espectro de refletância de amostras de contrafilés (*M. L. lumorum*) bovinos em diferentes tempos de oxigenação (Oxig): 30 e 60 min e 1 dia.

3.1.4 Definição dos espectros de referência

Dos três padrões avaliados, a de OMB parece ser a mais difícil de alcançar os 100% requeridos. Isto porque a oxigenação não é garantida, seja pela baixa penetração do oxigênio devido à alta TCO das carnes nos tempos 30 e 60 minutos de exposição ao oxigênio, seja porque em 24 h de *blooming* foi observado o início de uma oxidação que pode influenciar os demais cálculos ao utilizá-lo como padrão de OMB. Desta forma, sugere-se que o padrão de OMB seja obtido similarmente ao método de Krzywicki, ou seja, através da diferença da soma das demais formas químicas (Eq. 8).

Para os demais padrões, conforme discutido nas seções específicas, a escolha fica entre os oxidantes ferricianeto e nitrito para 100% MMb, ambos com estabilização por 1 dia, e da leitura imediatamente no corte fresco (Bloom-0) ou indução química com ditonito (seguido de embalagem a vácuo e estabilização por 1 dia; ditio-1d) para 100% DMb. O espectro de refletância dos valores K/S de cada um destes tratamentos é representado na Figura 5.

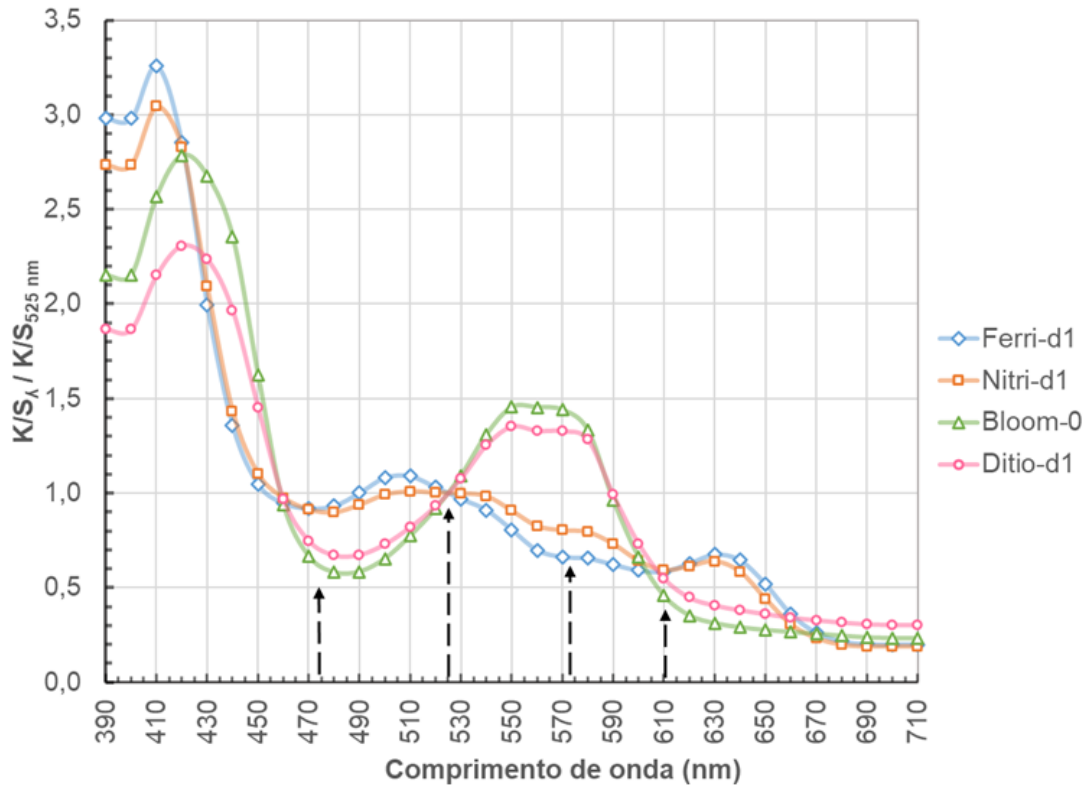


Figura 5. Espectro dos valores de reflectância convertidos a valores K/S de amostras de contrafilés (*M. L. lumbrorum*) bovinos em diferentes tratamentos: Ferri-1d = imersão em ferricianeto de potássio (1%/1 min) e leitura após 1 dia (a 4°C); Nitri-1d = imersão em nitrito de sódio (1%/1 min) e leitura após 1 dia (a 4°C); Bloom-0 = leitura imediatamente após corte; e Ditio-1d = imersão em ditonito de sódio (10%/1 min), embalagem a vácuo e leitura após 1 dia (a 4°C).

Para o padrão de MMb, sugere-se o uso do oxidante ferricianeto por conferir uma maior proporção de MMb (medida pelo método de Krzywicki; Tabela 2) e pelo valor menor da razão K/S 572/525 (Tabela 8 e Figura 4), o que o distancia mais do ponto isobéstico das duas outras formas (OMb e DMb) e torna possível uma melhor predição da proporção de MMb. Embora a cor aparente do pigmento oxidado pelo nitrito tenha uma relação com a percepção sensorial (Sammel *et al.*, 2002), esta análise não foi feita neste trabalho. Além disso, deve-se considerar as mudanças na cor interna do músculo devido as reações de cura, conforme discutido, indicado pela não estabilização dos valores de K/S 572/525 após 1 dia de armazenamento, embora a proporção de MMb tenha sido estável neste período.

Tabela 8. Valores da razão K/S dos pigmentos químicas de referência de acordo com os tratamentos em amostras de contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos.

Pigmento	Tratamento ¹	Razão K/S		
		474/525	572/525	610/525
Metamioglobina, MMb	Ferri-1d	0,93±0,02	0,66±0,09	0,59±0,05
	Nitri-1d	0,91±0,02	0,82±0,11	0,59±0,04
Deoximioglobina, DMb	Bloom-0	0,64±0,03	1,42±0,03	0,46±0,04
	Ditio-1d	0,73±0,07	1,32±0,02	0,55±0,06

¹ Ferri-1d = imersão em ferricianeto de potássio (1%/1 min) e leitura após 1 dia (a 4°C); Nitri-1d = imersão em nitrito de sódio (1%/1 min) e leitura após 1 dia (a 4°C); Bloom-0 = leitura imediatamente após corte; e Ditio-1d = imersão em ditionito de sódio (10%/1 min), embalagem a vácuo e leitura após 1 dia (a 4°C).

Para o padrão de DMb, a sugestão de uso é da leitura nas amostras recém cortadas (Bloom-0). Apesar da proporção de DMb ser estatisticamente a mesma (Tabela 4), o valor de K/S 474/525 é menor do que nas amostras ditio-1 (Tabela 8 e Figura 4). Além disso, a DMb é facilmente obtida, bastando apenas fazer a leitura com o colorímetro no interior da carne imediatamente após obtenção do corte. Deve-se garantir, no entanto, que a amostra possua uma espessura de, pelo menos 2,5 cm, para garantir o princípio da refletividade (Girolami *et al.*, 2013), e que apenas uma leitura seja feita devido à instabilidade da forma química quando exposta ao ar atmosférico (AMSA, 2012).

Logo, os cálculos para determinação da proporção dos pigmentos DMb e MMb pelo método K/S na avaliação da oxigenação e estabilidade ao armazenamento neste experimento foram conduzidos utilizando as razões K/S 572/525 e K/S 474/525 dos padrões de referência Ferri-1d e Bloom-0 (Tabela 8) nas equações 2 e 3, e a proporção de OMB obtida por diferença (Eq. 8).

3.2 Avaliação durante a oxigenação da carne

Ambos os métodos de cálculo para estimar as proporções dos pigmentos redox da mioglobina fornecem inconsistências quanto a valores inferiores a 0% e superiores a 100% (Tabela 9), o que precisa ser reajustado, seja removendo os *outliers* ou assumindo que nesses casos, as amostras assumem valores dos extremos (100% ou 0% de determinado pigmento), conforme sugerido por Mancini *et al.* (2003) e assumido por outros autores que observaram este mesmo fenômeno (Li *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2015).

Tabela 9. Média e desvio padrão (DP) e coeficientes de correlação (em itálico) dos pigmentos químicos da mioglobina, estimados pelos métodos de Krzywicki (K-MMb, K-DMb e K-OMb) e K/S (MMb, DMb e Omb), e índices de cor CIELAB obtidos de contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos durante a oxigenação por 60 min (a 4°C).

	Médias	DP	K-MMb	K-DMb	K-OMb	MMB	DMB	OMB	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>C</i> *
K-MMb (%)	10,39	3,96										
K-DMb (%)	37,93	24,53	<i>-0,35*</i>									
K-OMb (%)	51,68	23,42	<i>0,20*</i>	<i>-0,99*</i>								
MMB (%)	-0,33	2,54	<i>0,09</i>	<i>0,04</i>	<i>-0,06</i>							
DMB (%)	34,13	33,02	<i>-0,14**</i>	<i>0,96*</i>	<i>-0,99*</i>	<i>0,04</i>						
OMB (%)	66,20	33,21	<i>0,13**</i>	<i>-0,96*</i>	<i>0,99*</i>	<i>-0,11</i>	<i>-0,99*</i>					
<i>L</i> *	40,65	3,65	<i>0,24*</i>	<i>-0,48*</i>	<i>0,46*</i>	<i>-0,29*</i>	<i>-0,49*</i>	<i>0,51*</i>				
<i>a</i> *	19,35	3,32	<i>0,66*</i>	<i>-0,75*</i>	<i>0,67*</i>	<i>-0,23*</i>	<i>-0,66*</i>	<i>0,67*</i>	<i>0,79*</i>			
<i>b</i> *	11,96	3,41	<i>0,49*</i>	<i>-0,85*</i>	<i>0,80*</i>	<i>-0,21*</i>	<i>-0,80*</i>	<i>0,81*</i>	<i>0,82*</i>	<i>0,96*</i>		
<i>C</i> *	22,78	4,57	<i>0,60*</i>	<i>-0,79*</i>	<i>0,73*</i>	<i>-0,23*</i>	<i>-0,72*</i>	<i>0,73*</i>	<i>0,81*</i>	<i>0,99*</i>	<i>0,99*</i>	
<i>h</i> (°)	31,13	3,45	<i>0,27*</i>	<i>-0,92*</i>	<i>0,92*</i>	<i>-0,13**</i>	<i>-0,92*</i>	<i>0,92*</i>	<i>0,71*</i>	<i>0,81*</i>	<i>0,93*</i>	<i>0,86*</i>

MMb = metamioglobina; DMb = deoximioglobina; e Omb = oximioglobina; *L**= luminosidade; *a**= índice de vermelho; *b**= índice de amarelo; *C**= saturação; e *h*° = tonalidade.

* P<0,01; **P<0,05.

As proporções dos pigmentos redox da mioglobina durante a oxigenação, calculadas tanto por Krzywicki, quanto por K/S, são apresentados na Tabela 10. A proporção de MMb foi afetada apenas pelo método de avaliação, sendo maior no método de Krzywicki, isso explica a ausência de correlação entre os métodos ($r = 0,09$). Embora nenhuma MMb tenha sido induzida nesta etapa do experimento, o método matemático de Krzywicki apresentou uma proporção positiva para este pigmento, enquanto o método K/S forneceu valores médios próximo a 0%, sendo mais consistentes pois vão de encontro com o esperado, uma vez que as amostras estavam frescas, este mesmo fato foi encontrado por Hernández *et al.* (2015).

Tabela 10. Efeitos do método de avaliação (Krzywicki e K/S) e do tempo de oxigenação (a 4°C) nas proporções das formas químicas da mioglobina na superfície de contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos.

Efeitos	Fonte de Variação	Forma química (%)		
		MMb	DMb	OMb
Método, M	Krzywicki	10,39 ^x	37,93	51,68
	K/S	-0,33 ^y	34,13	66,20
Tempo, T (min)	0	5,64	91,06	3,30
	10	4,76	38,27	56,97
	20	4,91	28,74	66,35
	30	4,78	25,55	69,67
	40	5,10	23,77	71,13
	50	4,99	22,95	72,06
	EPM	0,29	1,29	1,34
<i>Pr < F²</i>	M	0,766	<0,001	<0,001
	T	<0,001	0,015	<0,001
	M × T	0,999	<0,001	<0,001

MMb = metamioglobina; DMb = deoximioglobina; OMb = oximioglobina; e EPM = erro padrão da média (n = 140).

¹ Probabilidades significativas ($P < 0,05$) foram destacadas em negrito.

^{x,y} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem ($P < 0,05$) pelo teste F

Para as proporções de OMb e DMb, estas foram afetadas pela interação, sendo os efeitos decompostos, ajustados ($P < 0,01$) para uma equação de crescimento e decaimento exponencial, respectivamente, e representados na Figura 6. Ambos os métodos descreveram o comportamento esperado para a oxigenação, isso vai de encontro a alta correlação positiva observada (Tabela 9), que se traduz no decréscimo da DMb, o aumento da OMb e a estabilidade

da MMb. Novamente, o método K/S parece ser mais coerente, com maior proporção de DMb no tempo zero (98,35 x 83,54%) e de Omb (81,23 x 61,73%) após a completa oxigenação.

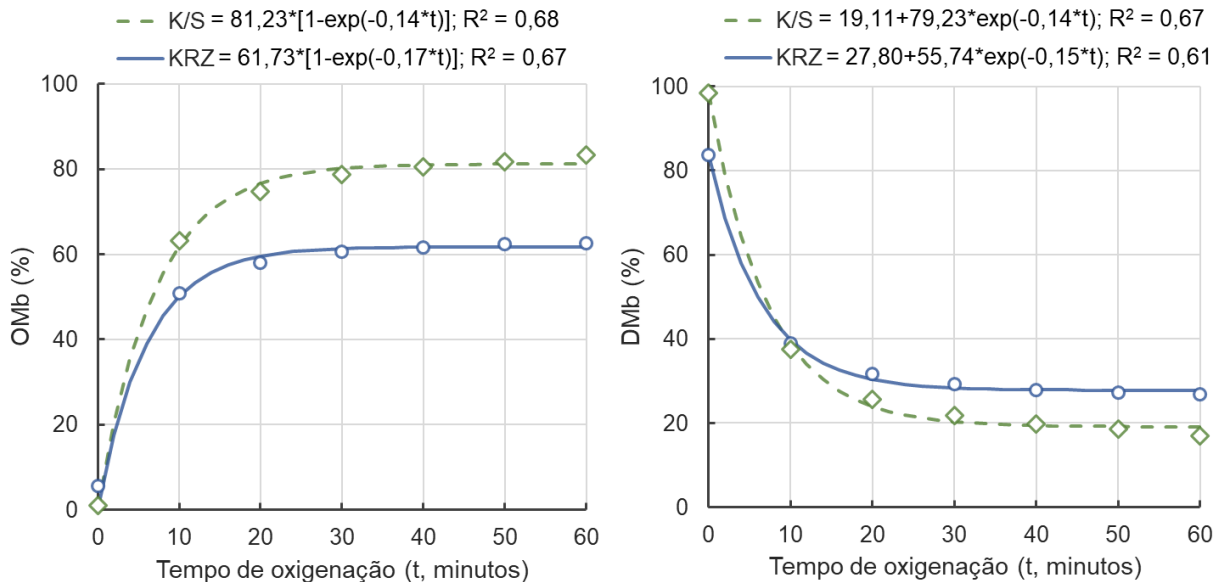


Figura 6. Efeito dos métodos de avaliação das formas química da mioglobina pelo método de Krzywicki (KRZ) e K/S nas proporções de oximioglobina (Omb) e de deoximioglobina (DMb) durante a oxigenação (a 4 °C) de contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos.

A exposição da molécula de deoximioglobina ao oxigênio resultou em uma rápida mudança no teor de pigmentos relativos, de DMb para Omb, que se estabilizou a partir de 20-30 min. Isto está de acordo as observações de Lee *et al.* (2008b) que relataram que 40% das alterações ocorreram nos 10 minutos iniciais da exposição do corte de *Longissimus thoracis* ao oxigênio e que o 90% do percentual de oximioglobina foram atingidos durante os primeiros 60 minutos em exposição, e para o músculo *Gluteus medius*, de 50 a 80% das mudanças ocorrem na primeira hora Lee *et al.* (2008a).

À medida que o oxigênio se difunde na superfície da carne recém cortada, a cor característica vermelho púrpura do pigmento DMb vai se alterando para um vermelho cereja brilhante da Omb, devido à alta afinidade da mioglobina pelo O₂ (Jacob, 2020; Ramos and Gomide, 2017). Esta mudança de cor é observada por um acréscimo concomitante nos valores de a* e b* ao decorrer do tempo de oxigenação, traduzindo em mudança tanto na intensidade (C*) quanto na tonalidade (h) da cor (Figura 7). Estas alterações também foram observadas por Aroeira *et al.* (2017) e Hernández Salueña *et al.* (2019). As coordenadas C* ($r = 0,73$; $P < 0,01$)

e h° ($r = 0,92$; $P < 0,01$) possuem uma correlação alta positiva com a OMB, independentemente do método utilizado para o cálculo de estimativa do pigmento, sendo estes possíveis de serem utilizados como índices de oxigenação (*blooming*), diferentemente da comum associação com o índice a^* .

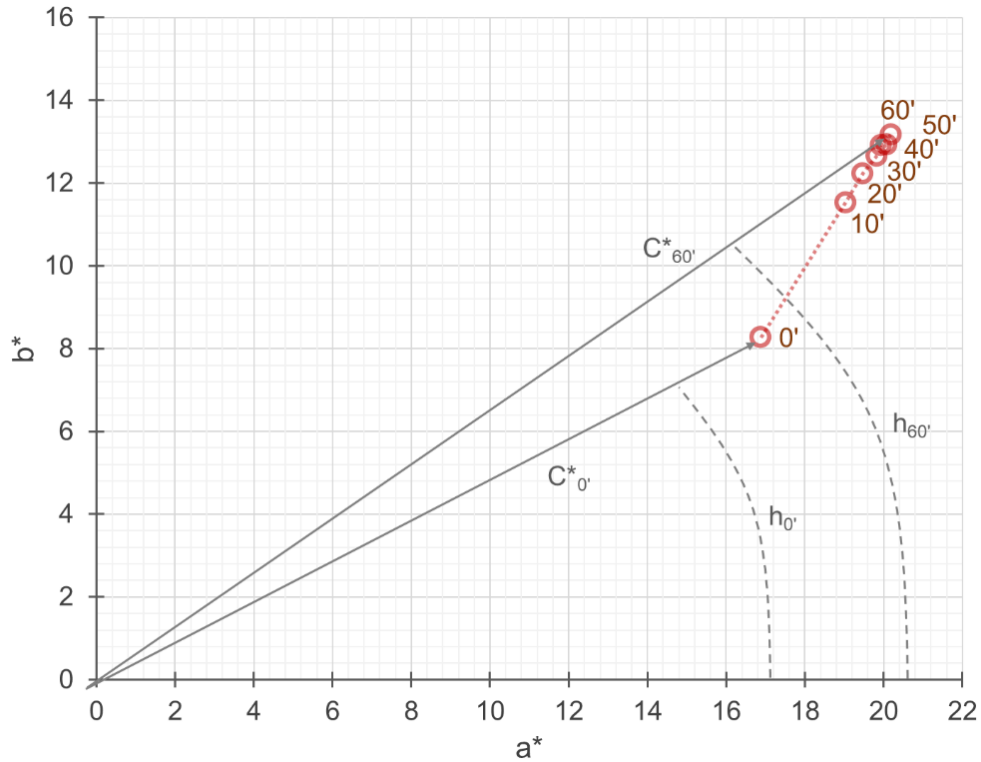


Figura 7. Evolução dos índices de cor em contrafilés (*M. L. lumbrorum*) bovinos com os tempos de oxigenação (0 a 60 min) no plano das coordenadas cromáticas ($a^* \times b^*$) do diagrama CIELAB.

Embora a luminosidade (L^*) também tenha aumentado ($P < 0,05$) durante a oxigenação, este aumento foi menor do que os demais índices (Figura 8), o que também foi observado por Rentfrow *et al.* (2004).

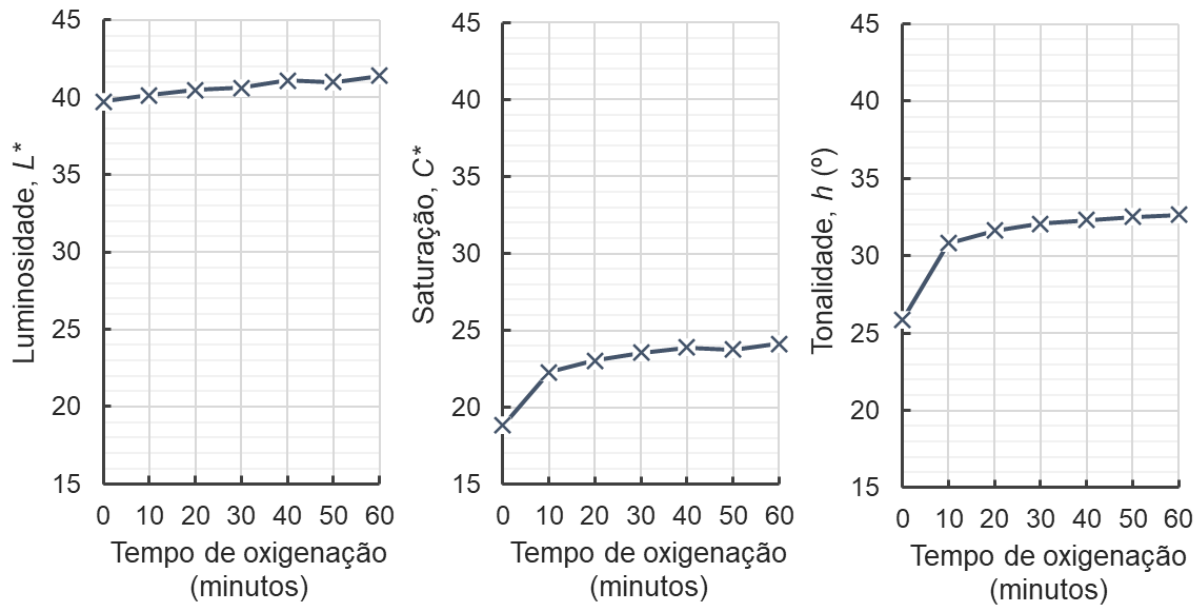


Figura 8. Evolução dos índices de cor CIELCH em contrafilés (*M. L. lumbrorum*) bovinos durante oxigenação a 4 °C.

3.3 Avaliação durante o armazenamento refrigerado

Assim como na oxigenação, os diferentes métodos para cálculo da proporção de formas redox da mioglobina ao longo do armazenamento refrigerado também resultaram em valores negativos (abaixo de 0%) e acima de 100% (Tabela 11). De qualquer forma, o comportamento observado das formas redox foi o mesmo entre os dois métodos ($r > 0,90$), em que se espera uma redução no teor de OMb com a sua progressiva oxidação à MMb (Tabela 12).

Tabela 11. Média e desvio padrão (DP) e coeficientes de correlação (em itálico) dos pigmentos químicos da mioglobina, estimados pelos métodos de Krzywicki (K-MMb, K-DMb e K-OMb) e K/S (MMb, DMb e OMb), e índices de cor CIELAB obtidos em contrafilés (*M. L. lumbrorum*) bovinos durante o armazenamento refrigerado por 8 dias (a 2°C).

	Médias	DP	K-MMb	K-DMb	K-OMb	MMB	DMB	OMB
K-MMb (%)	26,83	7,90						
K-DMb (%)	16,20	12,76	<i>-0,30*</i>					
K-OMb (%)	56,97	12,81	<i>-0,32*</i>	<i>-0,81*</i>				
MMB (%)	29,70	15,63	<i>0,95*</i>	<i>-0,04</i>	<i>-0,54*</i>			

DMB (%)	8,03	13,24	-0,24*	0,98*	-0,82*	0,01		
OMB (%)	62,27	20,55	-0,57*	-0,60*	0,94*	-0,76*	-0,65*	
L*	39,77	3,73	-0,10	-0,51*	0,57*	-0,28*	-0,52*	0,55*
a*	17,93	4,43	-0,47*	-0,55*	0,84*	-0,70*	-0,54*	0,87*
b*	13,23	3,17	-0,20**	-0,71*	0,83*	-0,46*	-0,70*	0,80*
C*	22,31	5,33	-0,39*	-0,61*	0,85*	-0,62*	-0,60*	0,86*
h (°)	36,49	3,49	0,71*	-0,54*	0,10	0,60*	-0,54*	-0,11

MMb = metamioglobina; DMb = deoximioglobina; e Omb = oximioglobina; L*= luminosidade; a*= índice de vermelho; b*= índice de amarelo; C*= saturação; e h° = tonalidade.

* P<0,01; **P<0,05.

Tabela 12. Efeitos do método de avaliação (Krzywicki e K/S) e do tempo de armazenamento (a 2°C) nas proporções das formas redox da mioglobina na superfície de contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos.

Efeitos	Fonte de Variação	Forma redox (%)		
		MMb	DMb	OMB
Método, M	Krzywicki	26,83	16,20 ^x	56,97
	K/S	29,70	8,03 ^y	62,27
Tempo, T (dias)	0	11,60	7,17 ^a	81,24
	1	13,42	7,03 ^a	79,54
	2	19,23	7,52 ^{ab}	73,25
	3	25,12	9,08 ^{abc}	65,80
	4	28,56	12,41 ^{cd}	59,04
	5	31,53	11,98 ^{cd}	56,49
	6	33,77	14,31 ^c	51,92
	7	39,85	14,65 ^c	45,51
	8	38,13	21,14 ^e	40,73
<i>Pr</i> < <i>F</i> ²	EPM	0,67	0,73	0,93
	M	<0,001	<0,001	<0,001
	T	0,022	<0,001	<0,001
	M × T	<0,001	0,999	<0,001

MMb = metamioglobina; DMb = deoximioglobina; Omb = oximioglobina; e EPM = erro padrão da média (n = 160).

¹ Probabilidades significativas (P < 0,05) foram destacadas em negrito.

^{x,y} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem (P < 0,05) pelo teste F.

^{a,e} Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem (P < 0,05) pelo teste de Duncan.

O pigmento de DMb foi afetado pelo método de avaliação e tempo de armazenamento, porém de forma isolada. Para ambos os métodos, a proporção de DMb aumentou com o armazenamento, porém os valores foram maiores quando do uso do método de Krzywicki. Já

para as proporções de MMb e OMb, estas foram afetadas pela interação do método x tempo de armazenamento (Figura 9). No entanto, com o decorrer do armazenamento, o aumento da MMb foi mais pronunciado no método K/S. Além de estimar maiores proporções de DMb, no método de Krzywicki a proporção de MMb inicia relativamente alta (próximo de 15%) já no dia zero.

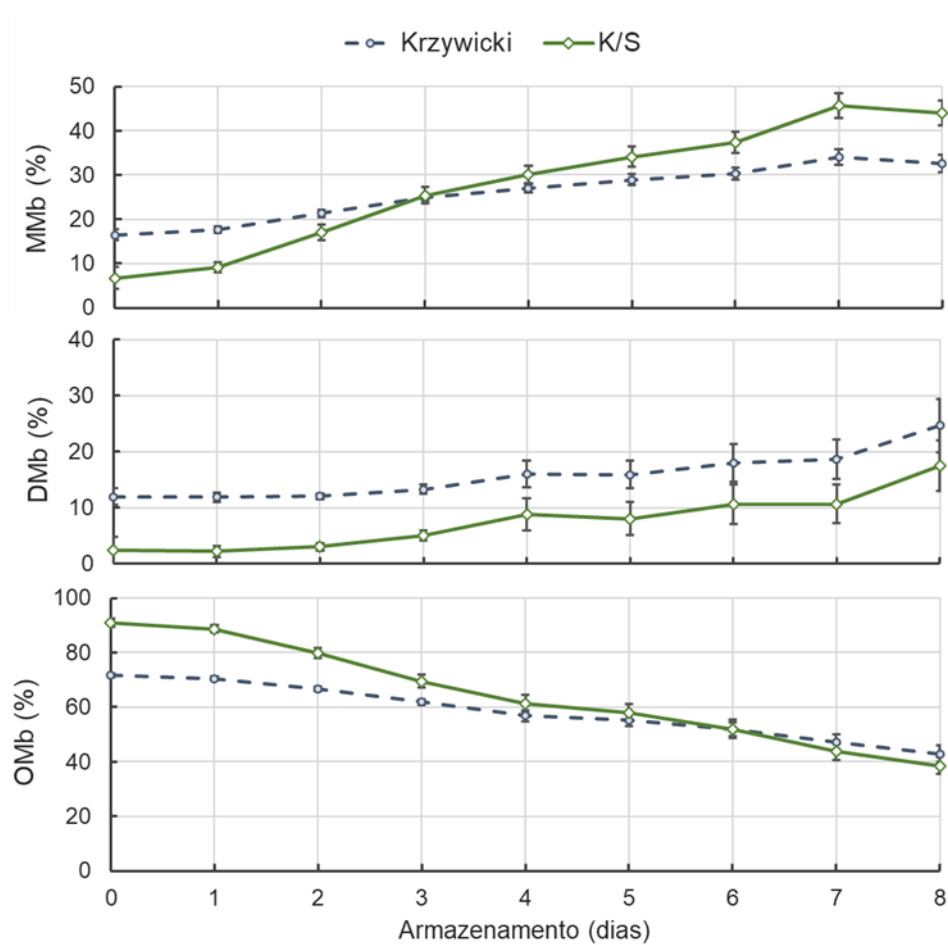


Figura 9. Efeito dos métodos de avaliação (Krzywicki x K/S) das formas redox da mioglobina na proporção de metamioglobina (MMb) e oximioglobina (OMb) durante o armazenamento (a 2 °C) de músculo (*L. lumbrorum*) bovinos.

Os teores e comportamento das formas redox durante oito dias de armazenamento obtidos neste trabalho são similares ao encontrado por Cardoso *et al.* (2019) das amostras controle de *L. lumbrorum*, que também utilizou Krzywicki para estimar as formas redox do pigmento.

O período de exposição da carne inclui as fases de oxigenação (*blooming*) e oxidação, em que as contribuições relativas de cada pigmento variam no tempo, mas que afetam a estabilidade de cor durante o armazenamento (Jacob, 2020). No primeiro momento a exposição ao oxigênio favorece a cor da carne, porém a contínua exposição durante o armazenamento faz com que este atue como um oxidante para a mioglobina (Ledward, 1972), alterando o estado do ferro heme de Fe^{+2} para Fe^{+3} e oxidando a Omb e, eventualmente a DMb a MMb.

Logo, a extensão dessa mudança de cor é dependente não somente do tempo, mas das condições de armazenamento, pH, idade, espécie, a TCO e MRA. Em seu estudo, Cardoso *et al.* (2019) observaram uma redução da MRA no sexto dia de armazenamento de *L. lumbrorum* em condições análogas deste experimento. Estes e outros autores (Mancini and Hunt, 2005; McKenna *et al.*, 2005) sugerem que a queda da MRA seja oriunda do esgotamento desse mecanismo (ação enzimática e NADH disponível). O surgimento do pigmento de MMb, conferindo o tom amarronzado na superfície da carne, começa nas camadas subsuperficiais e se esta é detectada ou não pelo consumidor, depende do grau de dispersão e da profundidade da penetração da luz (Swatland, 2004).

Segundo Hood and Riordan (1973), que avaliaram o comportamento da compra por consumidores nos mercados, se a carne no *display* estiver descolorida pela presença de 10% de MMb (calculados pela razão de KS 572/525) as vendas podem cair em 40%, podendo a carne ser rejeitada quando os níveis de MMb são próximos a 20%. Logo, o teor de mioglobina encontrado é um determinante para a vida útil da carne, conhecer os parâmetros correlacionados a proporção deste pigmento podem ser relevantes para a previsão da decisão de compra do consumidor.

Em uma pesquisa mais recente, Mancini *et al.* (2022) relataram que os avaliadores treinados descreveram as amostras com 37% de MMb na superfície como vermelha escura a amarronzada, e o valor $a^* = 23,1$ (obtido utilizando iluminante A e observador padrão de 10°) foi associado a um nível de 50% de MMb. Estes autores, no entanto, não deixaram claro qual o método usado no cálculo da MMb. Van den Oord and Wesdorp (1971) alegaram que a carne é completamente rejeitada a proporção de MMb ou Omb atinge 50%.

No caso deste trabalho, levando em consideração as literaturas citadas, as mudanças na superfície da carne seriam detectadas a partir do segundo dia de exposição, em que a proporção de MMb em ambos os métodos são próximos a 20%, e os bifes em *display* seriam completamente rejeitados a partir do 6^o dia de exposição, pois, via K/S, as amostras atingiram aproximadamente 38% de MMb e 50% de OMb. Pelo método de Krzywicki, não foi atingida teores muito superiores a 30% de MMb ao decorrer dos 8 dias de análise.

Ao decorrer dos dias, com o aumento gradual do pigmento de MMb, os valores de a^* e b^* diminuem (Figura 10). Em termos de coordenadas polares, as mudanças nos valores de C^* são ainda mais perceptíveis e maiores que as mudanças nos valores de h . Os valores de C^* reduziram e os valores de h aumentaram com o armazenamento, devido à oxidação gradual dos pigmentos (Figuras 10 e 11), o que explica a diminuição da correlação entre h° e o pigmento MMb, sendo um indicador do processo de descoloração da carne bovina durante o armazenamento. A luminosidade (L^*) tem uma redução pequena associada ao tempo, porém consistente. O aumento de L^* no dia 1 e a estabilidade até o segundo dia está associada à oxigenação já discutido anteriormente e o decréscimo de L^* nos dias seguintes de armazenamento é associado a oxidação dos pigmentos, este comportamento também foi observado por Cardoso *et al.* (2013) que associou ao comum aumento do pH da carne durante a estocagem.

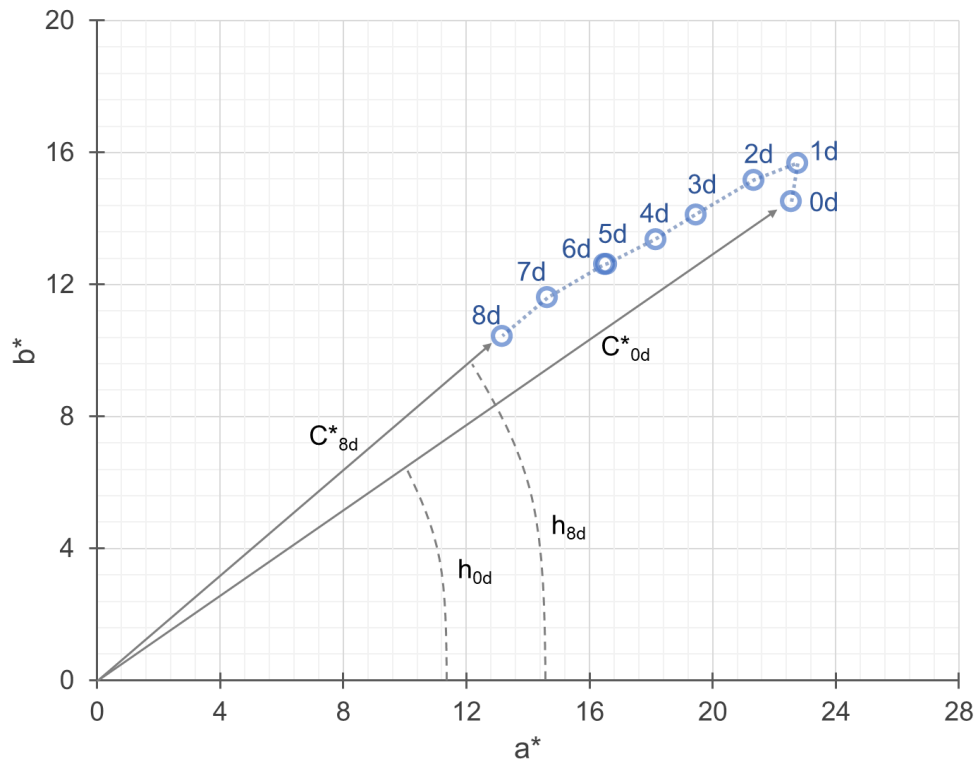


Figura 10. Evolução dos índices de cor em contrafilés (*M. L. lumbrorum*) bovinos com os tempos de armazenamento refrigerado (0 a 8 dias, 2°C) no plano das coordenadas cromáticas ($a^* \times b^*$) do diagrama CIELAB.

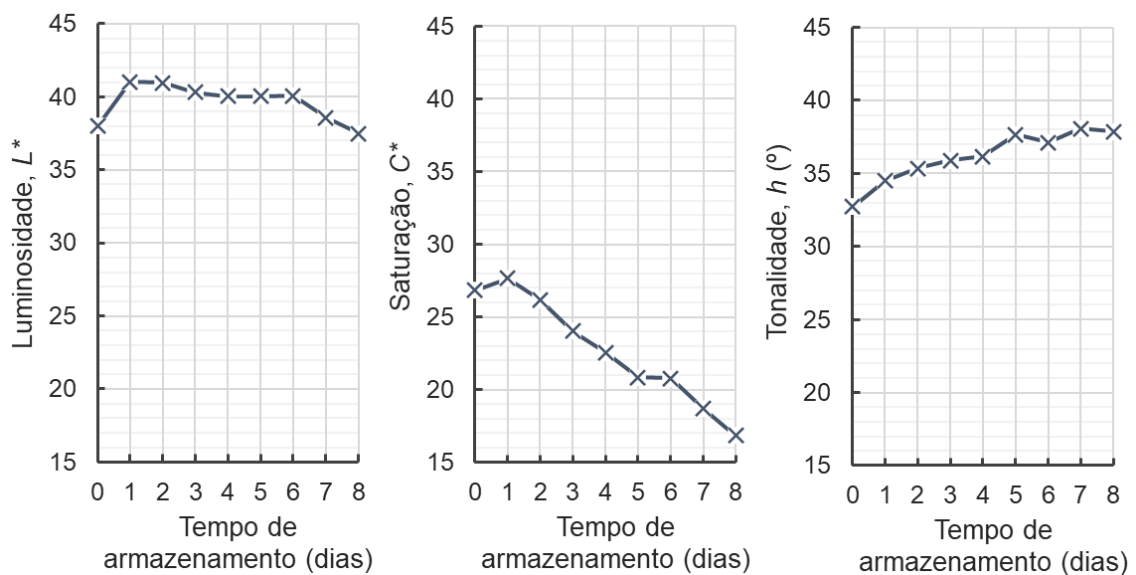


Figura 11. Evolução dos índices de cor CIELCH em contrafilés (*M. L. lumbrorum*) bovinos durante armazenamento a 2 °C.

4. Conclusões

Este trabalho esclarece a necessidade de obter tanto as proporções dos pigmentos quanto os dados colorimétricos, pois, apesar de serem relacionados, expressam informações diferentes. As mudanças dos parâmetros de cor em carnes que ocorre durante a oxigenação e a oxidação do pigmento durante o armazenamento acontece dentro do primeiro quadrante do círculo trigonométrico, mas, apesar de ser sutil, há grandes impactos na aparência da carne. Neste trabalho tivemos alterações nos índices a^* e b^* , sendo assim, os índices C^* e h° que são associados aos dois índices citados anteriormente pode ser um indicador das mudanças da cor carne, principalmente o h° , visto que possui uma alta correlação com o processo de oxigenação em que há aumento da OMb, e, a diminuição da sua correlação é associada ao processo de oxidação do pigmento para MMb durante a estocagem.

Embora ambos os métodos de quantificação tenham desempenhado de forma divergente e extrapolem os dados percentuais, os dois acompanharam os diferentes comportamentos associados aos processos de mudança de pigmento, tanto na oxigenação, quanto na oxidação do pigmento durante o armazenamento refrigerado. O método de Krzywicki é muito conveniente por não ser necessário a obtenção de todos os pigmentos padrões, conseqüentemente é um método com um menor custo e mais rápido, porém deve ser questionado justamente pela ausência dos padrões, gerando proporções super e subestimadas, uma conseqüência do método por não levar em consideração os dados qualitativos e quantitativos do grupo amostral, sendo então, um ponto forte do método de K/S que possui uma predição mais próxima do que é esperado.

Como sugestão para complementar este estudo, recomenda-se uma análise sensorial para fazer a devida associação entre os dados colorimétricos, proporções das formas redox com as percepções visuais.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Federal de Lavras – UFLA, ao Departamento de Ciência dos Alimentos Federal – UFLA, às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro para condução desta pesquisa.

Referências

- Amsa (2012). *Meat Color Evaluation Guide*, Champaign, IL, American Meat Science Association (AMSA).
- Aroeira, C.N., Torres Filho, R.A., Fontes, P.R., Ramos, A.L.S., Gomide, L.a.M., Ladeira, M.M. and Ramos, E.M. (2017). "Effect of freezing prior to aging on myoglobin redox forms and CIE color of beef from Nellore and Aberdeen Angus cattle". *Meat Science*, Vol. 125 No., pp. 16-21. doi: 10.1016/j.meatsci.2016.11.010
- Cardoso, G.P., Andrade, M.P.D., Rodrigues, L.M., Massingue, A.A., Fontes, P.R., Ramos, A.L.S. and Ramos, E.M. (2019). "Retail display of beef steaks coated with monolayer and bilayer chitosan-gelatin composites". *Meat Science*, Vol. 152 No., pp. 20-30. doi: 10.1016/j.meatsci.2019.02.009
- Cardoso, G.P., Aroeira, C.N., Siqueira, L.T., Silva, V.D.M., Ramos, A.L.S. and Ramos, E.M. Imagens de video na avaliação da deterioração da cor de carnes suína expostas em display refrigerado. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnologia de Alimentos (CYTAL), 2013 Rosario. Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios (AATA), 6.
- Dean, R.W. and Ball, C.O. (1960). "Analysis of the myoglobin fractions on the surfaces of beef cuts". *Food Technology*, Vol. 14 No., pp. 271-286. doi:
- Denzer, M., Comstock, H., Mowery, C., Maheswarappa, N., Mafi, G., Van Overbeke, D. and Ramanathan, R. (2019). "Characterization of the cofactors involved in non-enzymatic metmyoglobin reduction in vitro". *Meat and Muscle Biology* Vol. 3 No. 2. doi: 10.22175/mmb.10780
- Girolami, A., Napolitano, F., Faraone, D. and Braghieri, A. (2013). "Measurement of meat color using a computer vision system". *Meat Science*, Vol. 93 No. 1, pp. 111-118. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.08.010
- Hernández, B., Sáenz, C., Alberdi, C. and Diñeiro, J.M. (2015). "Comparison between two different methods to obtain the proportions of myoglobin redox forms on fresh meat from reflectance measurements". *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 52 No. 12, pp. 8212-8219. doi: 10.1007/s13197-015-1917-x
- Hernández, B., Sáenz, C., Alberdi, C. and Diñeiro, J.M. (2016). "CIELAB color coordinates versus relative proportions of myoglobin redox forms in the description of fresh meat appearance". *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 53 No. 12, pp. 4159-4167. doi: 10.1007/s13197-016-2394-6
- Hernández Salueña, B., Sáenz Gamasa, C., Diñeiro Rubial, J.M. and Alberdi Odriozola, C. (2019). "CIELAB color paths during meat shelf life". *Meat Science*, Vol. 157 No., pp. 107889. doi: 10.1016/j.meatsci.2019.107889
- Honikel, K.O. (2008). "The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products". *Meat Science*, Vol. 78 No. 1-2, pp. 68-76. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.05.030
- Hood, D.E. and Riordan, E.B. (1973). "Discolouration in pre-packaged beef: measurement by reflectance spectrophotometry and shopper discrimination". *International Journal of Food Science & Technology*, Vol. 8 No. 3, pp. 333-343. doi: 10.1111/j.1365-2621.1973.tb01721.x
- Jacob, R. (2020). "Implications of the variation in bloom properties of red meat: A review". *Meat Science*, Vol. 162 No., pp. 108040. doi: 10.1016/j.meatsci.2019.108040
- Jose, C. and Mcgilchrist, P. (2022). "Ageing as a method to increase bloom depth and improve retail colour in beef graded AUS-MEAT colour 4". *Meat Science*, Vol. 183 No., pp. 108665. doi: 10.1016/j.meatsci.2021.108665

- Krzywicki, K. (1979). "Assessment of relative content of myoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin at the surface of beef". *Meat Science*, Vol. 3 No. 1, pp. 1-10. doi: 10.1016/0309-1740(79)90019-6
- Ledward, D.A. (1972). "Metmyoglobin reduction and formation in beef during aerobic storage at 1°C". *Journal of Food Science*, Vol. 37 No. 4, pp. 634-635. doi: 10.1111/j.1365-2621.1972.tb02713.x
- Ledward, D.A. 1992. Colour of raw and cooked meat. In: JOHNSTON, D. E., KNIGHT, M. K. & LEDWARD, D. A. (eds.) *The Chemistry of Muscle-based Foods*. . Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Lee, M.S., Apple, J.K., Yancey, J.W.S., Sawyer, J.T. and Johnson, Z.B. (2008a). "Influence of vacuum-aging period on bloom development of the beef gluteus medius from top sirloin butts". *Meat Science*, Vol. 80 No. 3, pp. 592-598. doi: 10.1016/j.meatsci.2008.02.006
- Lee, M.S., Apple, J.K., Yancey, J.W.S., Sawyer, J.T. and Johnson, Z.B. (2008b). "Influence of wet-aging on bloom development in the longissimus thoracis". *Meat Science*, Vol. 80 No. 3, pp. 703-707. doi: 10.1016/j.meatsci.2008.03.013
- Li, X., Lindahl, G., Zamaratskaia, G. and Lundström, K. (2012). "Influence of vacuum skin packaging on color stability of beef longissimus lumborum compared with vacuum and high-oxygen modified atmosphere packaging". *Meat Science*, Vol. 92 No. 4, pp. 604-609. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.06.006
- Lindahl, G. (2011). "Colour stability of steaks from large beef cuts aged under vacuum or high oxygen modified atmosphere". *Meat Science*, Vol. 87 No. 4, pp. 428-435. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.10.023
- Lindahl, G., Karlsson, A.H., Lundström, K. and Andersen, H.J. (2006). "Significance of storage time on degree of blooming and colour stability of pork loin from different crossbreeds". *Meat Science*, Vol. 72 No. 4, pp. 603-612. doi: 10.1016/j.meatsci.2005.09.018
- Mancini, R.A. and Hunt, M.C. (2005). "Current research in meat color". *Meat Science*, Vol. 71 No. 1, pp. 100-121. doi: 10.1016/j.meatsci.2005.03.003
- Mancini, R.A., Hunt, M.C. and Kropf, D.H. (2003). "Reflectance at 610 nanometers estimates oxymyoglobin content on the surface of ground beef". *Meat Science*, Vol. 64 No. 2, pp. 157-162. doi: 10.1016/S0309-1740(02)00174-2
- Mancini, R.A., Ramanathan, R., Hunt, M.C., Kropf, D.H. and Mafi, G.G. (2022). "Interrelationships between visual and instrumental measures of ground beef color". *Meat and Muscle Biology* Vol. 6 No. 1 (14040), pp. 1-8. doi: 10.22175/mmb.14040
- Mckenna, D.R., Mies, P.D., Baird, B.E., Pfeiffer, K.D., Ellebracht, J.W. and Savell, J.W. (2005). "Biochemical and physical factors affecting discoloration characteristics of 19 bovine muscles". *Meat Science*, Vol. 70 No. 4, pp. 665-682. doi: 10.1016/j.meatsci.2005.02.016
- Ramos, E.M. and Gomide, L.a.M. (2017). *Meat quality assessment: fundamentals and methodologies (in portuguese)*, Viçosa, MG, Brazil, Editora UFV.
- Rentfrow, G., Linville, M.L., Stahl, C.A., Olson, K.C. and Berg, E.P. (2004). "The effects of the antioxidant lipoic acid on beef longissimus bloom time". *Journal of Animal Science*, Vol. 82 No. 10, pp. 3034-7. doi: 10.1016/j.meatsci.2005.02.016
- Sammel, L.M., Hunt, M.C., Kropf, D.H., Hachmeister, K.A. and Johnson, D.E. (2002). "Comparison of assays for metmyoglobin reducing ability in beef inside and outside Semimembranosus muscle". *Journal of Food Science*, Vol. 67 No. 3, pp. 978-984. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb09439.x

- Stewart, M.R., Zipser, M.W. and Watts, B.M. (1965). "The use of reflectance spectrophotometry for the assay of raw meat pigments". *Journal of Food Science*, Vol. 30 No. 3, pp. 464-469. doi: 10.1111/j.1365-2621.1965.tb01787.x
- Swatland, H.J. (2004). "Progress in understanding the paleness of meat with a low pH.". *South African Journal of Animal Science*, Vol. 34 No. 2, pp. 1-7. doi:
- Van Den Oord, A.H.A. and Wesdorp, J.J. (1971). "Colour rating and pigment composition of beef: Relation between colour measurement by reflectance spectrophotometry, subjective colour evaluation, and the relative concentration of oxymyoglobin and ferric myoglobin in chilled retail-packed beef". *International Journal of Food Science & Technology*, Vol. 6 No. 1, pp. 15-20. doi: 10.1111/j.1365-2621.1971.tb01588.x
- Watts, B.M., Kendrick, J., Zipser, M.W., Hutchins, B. and Saleh, B. (1966). "Enzymatic Reducing Pathways in Meat". *Journal of Food Science*, Vol. 31 No. 6, pp. 855-862. doi: 10.1111/j.1365-2621.1966.tb03261.x
- Wu, S., Luo, X., Yang, X., Hopkins, D.L., Mao, Y. and Zhang, Y. (2020). "Understanding the development of color and color stability of dark cutting beef based on mitochondrial proteomics". *Meat Science*, Vol. 163 No., pp. 108046. doi: 10.1016/j.meatsci.2020.108046

ARTIGO 2

Artigo redigido conforme a norma do periódico *Meat Science*

“Versão Preliminar”

Predição das formas químicas da mioglobina na carne bovina via inteligência artificial

Prediction of beef myoglobin redox forms by artificial intelligence

Resumo

Objetivou-se montar um algoritmo de rede neural artificial capaz de determinar o percentual das formas químicas da mioglobina na superfície de bifes bovinos a partir de fotografias obtidas das amostras. As mudanças na cor da carne foram registradas durante a oxigenação e armazenamento em *display* refrigerado, além dos padrões de referência (100% de cada pigmento), tanto pelo colorímetro espectrofotômetro quanto pelo sistema de visão computacional (SVC). Foi utilizado mais de uma ferramenta para captura de imagem e testadas quanto a necessidade de calibração, para então serem inseridas no treinamento do algoritmo e

posteriormente para quantificação dos pigmentos pelo SVC, além do método tradicional matemático de Krzywicki como referência de predição dos pigmentos. A base de dados, composta por 1800 imagens, foi avaliada por uma *Multi Layer Perceptron* desenvolvida pelos autores, e, os modelos ajustados apresentaram uma acurácia média de 92,62% $\pm 2,22$ na classificação dos pigmentos. Os resultados deste trabalho são promissores, indicando que a tecnologia de visão computacional é uma ferramenta útil e precisa para prever as formas químicas da mioglobina e contribuir com as análises de qualidade de carnes.

Palavras-chave: visão computacional; inteligência artificial; redes neurais artificiais; pigmento; cor.

1 Introdução

A mioglobina é a principal proteína sarcoplasmática responsável pela cor da carne, atributo sensorial de alta relevância que impacta na decisão de compra do consumidor. A cor aparente é dependente da concentração da mioglobina e do seu estado redox (Mancini & Hunt, 2005). Há três formas químicas (redox) que a mioglobina da carne *in natura* pode assumir, sendo que elas coexistem e é observada a que apresenta a maior proporção. A oximioglobina (OMb) é o pigmento de coloração melhor aceita, sua característica é um tom vermelho cereja brilhante, associado ao frescor e qualidade da carne, já o pigmento deoximioglobina (DMb), de tom vermelho-púrpura é associado a cor do interior do músculo e as carnes embaladas a vácuo, enquanto a metamioglobina (MMb), formada a partir da oxidação do ferro ferroso (Fe^{+2}) da OMb e/ou DMb para ferro férrico (Fe^{+3}), é associada a falta de qualidade por apresentar um tom acastanhado (AMSA, 2012; Ramos & Gomide, 2017). Sabe-se que a cor da carne se altera durante o seu armazenamento, logo a eficiência da comercialização está diretamente relacionada a capacidade de se manter a cor atrativa para os consumidores (Cardoso, Dutra, Fontes, Ramos, Gomide, & Ramos, 2016; Hernández Salueña, Sáenz Gamasa, Diñeiro Rubial, & Alberdi Odriozola, 2019).

A análise instrumental da cor na carne é feita comumente através de colorímetros espectrofotômetros, em que se utiliza valores de reflectância em diferentes comprimentos de ondas para determinar a cor, comumente representada pelos sistemas CIELAB e CIELCH (AMSA, 2015). A reflectância é uma propriedade intrínseca dos objetos, e as três formas da mioglobina tem curvas espectrométricas distintas, sendo utilizado o espectro de reflectância

para a quantificação da concentração de pigmentos (Hernández Salueña et al., 2019). Contudo, a forma de funcionamento dos equipamentos e as metodologias utilizadas possuem algumas inconsistências que pode prejudicar a obtenção de informações significativas. Apesar da leitura da cor ser feita em pontos diferentes da carne, a área analisada é extremamente restrita, cerca de 2 a 5 cm² da área superficial segundo (Girolami, Napolitano, Faraone, & Braghieri, 2013), não sendo possível dados da totalidade da superfície da carne. Além disso, a cor obtida pelo colorímetro é dependente dos pigmentos presentes nas camadas abaixo da superfície da carne, que por sua vez são dependentes da capacidade de penetração do oxigênio (Ramos & Gomide, 2017). Segundo Girolami et al. (2013), a luz do colorímetro pode penetrar até 20 mm abaixo da superfície da carne e sabe-se que a penetração de oxigênio ocorre em uma profundidade bem menor (Jose & McGilchrist, 2022). Ou seja, a leitura instrumental pelo colorímetro fornece informações além do que é visto na superfície, e, desta forma, a leitura da cor diferente daquela que é vista pelo consumidor. Pelos mesmos motivos, a determinação pelo espectro de reflectância das formas químicas da mioglobina na superfície da carne é limitada (Artigo 1), mas que apesar de convenientes, podem não ser conclusivas (Piao, Denzer, Mafi, & Ramanathan, 2022).

Diante do exposto e do alinhamento com os atuais estudos, a avaliação das cores pela visão computacional (VC) pode ser uma alternativa ao colorímetro, pois a distribuição de cores das amostras pode ser quantificada em sua totalidade e por toda superfície aparente, se assemelhando mais a avaliação sensorial (Brosnan & Sun, 2004). Justamente por possuírem espectros únicos (AMSA, 2015), as formas químicas da mioglobina apresentam três diferentes tons de cor e, desta forma, a análise por VC pode ser capaz de estimar a proporção destes pigmentos na superfície da carne, de forma integral, com toda sua heterogeneidade, em um processo não destrutivo, objetivo, rápido e de baixo custo. Além de descrever a cor real da superfície da carne, a estimativa das formas químicas por VC pode auxiliar na descrição das mudanças graduais da cor de carnes em processos de oxigenação e, ou, oxidação, como por exemplo, durante o armazenamento refrigerado.

Na presente pesquisa, objetivou-se desenvolver um sistema de visão computacional capaz de estimar as formas químicas da mioglobina na superfície da carne bovina, utilizando redes neurais artificiais.

2 Materiais e Métodos

2.1 Base de dados

Para a composição do banco de dados utilizado no desenvolvimento do sistema de visão computacional (SVC), foram utilizados bifes, de aproximadamente 2,5 cm de espessura, de sete contrafilés (*M. Longissimus lumborum*) bovinos, obtidos 48 h *post-mortem* no comércio local de Lavras, MG, Brasil.

2.1.1 Oxigenação e armazenamento refrigerado

Os bifes, obtidos com ajuda de um molde, foram individualmente acondicionados em bandejas de isopor, embalados com filme de policloreto de vinila (PVC) altamente permeável ao oxigênio (taxa de transmissão de oxigênio de 6000–8000 cm³/m².dia a 25 °C e 760 mmHg), sem que tocasse a superfície do bife, e armazenados a 4 °C por 60 min para oxigenação (*blooming*). A seguir, as bandejas foram armazenadas em câmara climática (model EL202; EletroLab, São Paulo, SP, Brazil) a 2 °C por um período de 8 dias para acompanhamento da estabilidade da cor.

2.1.2 Padrões de referência

Os padrões de 100% pigmentos relativos da mioglobina, deoximioglobina (DMb), oximioglobina (OMb) e metamioglobina (MMb), foram obtidos conforme descrito no Artigo 1. Os padrões de DMb foram obtidos de duas formas, pela avaliação imediata da superfície recém-cortada dos bifes (antes da avaliação da oxigenação), e pela indução química com ditionito de sódio, submerso por 1 min em solução 10%, e manutenção em embalagem a vácuo por 0 e 15 min e nos dias 1, 2, 3 e 4 a 4 °C. Como padrões de OMb foram utilizados dados das amostras oxigenadas por 60 min e das armazenadas por 24 h. Os padrões de MMb também foram induzidos quimicamente, mas por duas formas, por imersão em solução de ferricianeto de potássio 1% e de nitrito de sódio 1% por 1 min e manutenção (a 4 °C) por 0, 15 min e por 1, 2, 3 e 4 dias.

2.2 Aquisição dos dados

A leitura de cor pelo colorímetro e a aquisição das imagens dos padrões de referência foram feitas nas amostragens descritas, a cada 10 min (7 pontos) nas amostras durante a oxigenação, e a cada dia (8 pontos) nas amostras durante o armazenamento refrigerado. Durante

a oxigenação e armazenamento, as amostras foram avaliadas continuamente, com o filme de PVC sendo retirado para obtenção dos dados e novamente colocado no sistema de embalagem.

2.2.1 Determinação dos pigmentos

A proporção de cada forma química da mioglobina foi obtida utilizando um colorímetro espectrofotômetro portátil CM-700 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japão), com porta de abertura com Φ 8 mm (MAV), iluminante A, ângulo do observador 10° e no modo de componente especular incluído (SCI). Os dados de reflectância da superfície da carne foram coletados de 390 a 710 nm, em um intervalo de 10 nm, usando uma média de cinco medições consecutivas (replicatas) em toda a superfície de cada amostra. Valores intermediários de refletância (473, 525 e 572 nm) foram calculados por interpolação linear e as proporções das formas químicas da mioglobina estimadas pelo método matemático de Krzywicki (1979).

2.2.2 Aquisição das imagens

A imagens das amostras foram obtidas em um estúdio fotográfico cuboide, com arestas internas de 24,5 cm e abertura no tampo superior de 8 cm de diâmetro para posicionamento das câmeras (Figura 1). A iluminação do estúdio era composta por quatro lâmpadas de LED (Opus, modelo LP 37097; 3,5 W, fluxo luminoso de 2101 lm, ângulo 36° e com temperatura 2700 K, para reproduzir características aproximadas do Iluminante A) dispostas nos quatro cantos superiores internos da caixa. O caixa era de fibras de média densidade (MDF) de cor preta fosca afim de minimizar quaisquer interferências de reflexão da luz. As imagens das amostras foram obtidas por dois aparelhos: uma câmera fotográfica; e uma câmera de um celular *smartphone*.



Figura 1. Fotografias do estúdio fotográfico e disposição da iluminação por lâmpadas LEDs.

A câmera fotografia utilizada foi uma Canon modelo DSRL T3i, com sensor CMOS (APS-C) de 12.2 *megapixels* e processador de imagem DIGIC 4, com lente EF-S 18-55 mm f/3.5-5.6 IS II. A câmera foi posicionada na abertura da caixa (perpendicularmente à amostra), a uma altura fixa de 185 mm da lente até os bifes, sendo configurada da seguinte forma: tempo de exposição 1/250 segundos; abertura do obturador f/6.3, ISO-100; distância focal de 18mm; sem flash; espaço de cor representado por sRGB, 72 dpi e formato de arquivo RAW (não compactado) para evitar perdas de informações.

O celular utilizado foi um *smartphone* Asus Zenfone Max Plus M2, com câmera traseira de 12 *megapixels*, sensor Sony IMX486 de tamanho 1/2,9" polegadas. As fotos foram obtidas através do aplicativo *Lightroom Photo & Video Editor* versão 7.4.1 (versão Android®). A distância entre a lente da câmera até a amostra foi de 245 mm e as configurações da câmera no aplicativo foram: velocidade do obturador 1/1080, ISO100; foco manual em 81% e equilíbrio de branco incandescente; sem flash; e as imagens salvas no formato DNG (formato de imagem RAW) com resolução de 96 dpi.

As imagens obtidas no sistema de cor sRGB foram calibradas utilizando um cartão *ColorChecker* (*ColorChecker Passport Photo 2*; X-Rite Inc) contendo uma paleta com 24 padrões de cores certificado pela Pantone®. Foi criado um perfil de calibração para cada

aparelho através do *software* ColorChecker Camera Calibration v. 2.2.0 (X-Rite Inc). Após a criação do perfil de cores, este foi utilizado no programa *Adobe Lightroom Classic®* para a calibração das fotografias das amostras. A temperatura das imagens foi ajustada no *Lightroom* para 2856 K. Todos os ajustes, tanto as configurações das câmeras e calibração foram determinadas de modo exploratório visando obter as melhores condições de imagem.

2.3 Desenvolvimento do algoritmo

Para desenvolvimento do SVC, via inteligência artificial (IA), foi utilizado um algoritmo de redes neurais multicamadas (*Multi-Layer Perceptron*; MLP), composta de camadas alinhadas de neurônios, em que as informações de entrada se propagam de camada a camada, até alcançar a camada de saída (Haykin, 2008). A escolha deste algoritmo foi feita pela simplicidade de implementação, boa capacidade de generalização, além de ser mais rápido no treinamento e apresentar bons resultados para o banco de dados utilizado. Todo o processo de treinamento é ilustrado na Figura 2.

A base de dados para o treinamento da MLP foram as amostras padrões, em que 100% dos pigmentos da superfície da carne foram convertidos a DMb, OMb e MMb (item 2.1.2). Foram escolhidas as condições que melhor garantiriam esta conversão em 100% do pigmento, conforme Artigo 1: para o padrão de DMb foram utilizados os dados obtidos imediatamente após o corte dos bifes (método direto); para OMb, foram selecionadas as amostras oxigenadas por 60 min e por 24 h; e para MMb as amostras oxidadas por ferricianeto e por nitrito, após estabilização por 24 h.

As imagens dos padrões, obtidas pela câmera e pelo celular, foram analisadas com e sem calibração, obtendo-se quatro condições de imagens (Figura 3), desta forma, foram criadas 4 bases de dados, sendo uma para cada condição de imagem. Cada base de dados, possuía 120 fragmentos de 200x200 pixels, sendo 30 de cada pigmento padrão e 30 de gordura de cobertura. Os fragmentos da gordura foram utilizados para verificar se a MLP classificaria a gordura aparente nas imagens (marmoreio) como uma quarta classe de pigmento e se era possível fazer a distinção entre as formas químicas da mioglobina e a gordura.

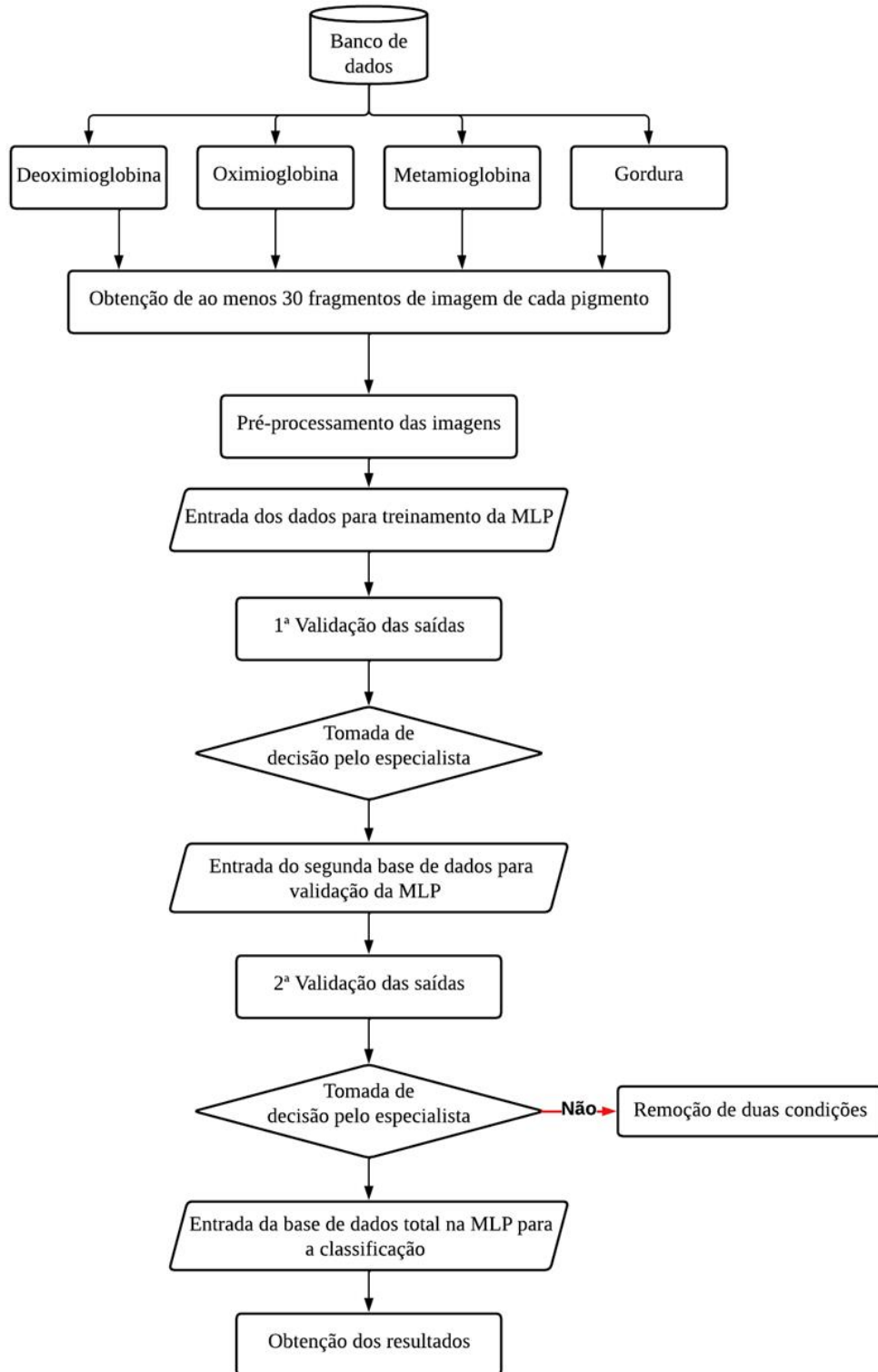


Figura 2. Fluxograma das etapas do treinamento da inteligência artificial (IA) utilizando a *Multi-Layer Perceptron* (MLP).

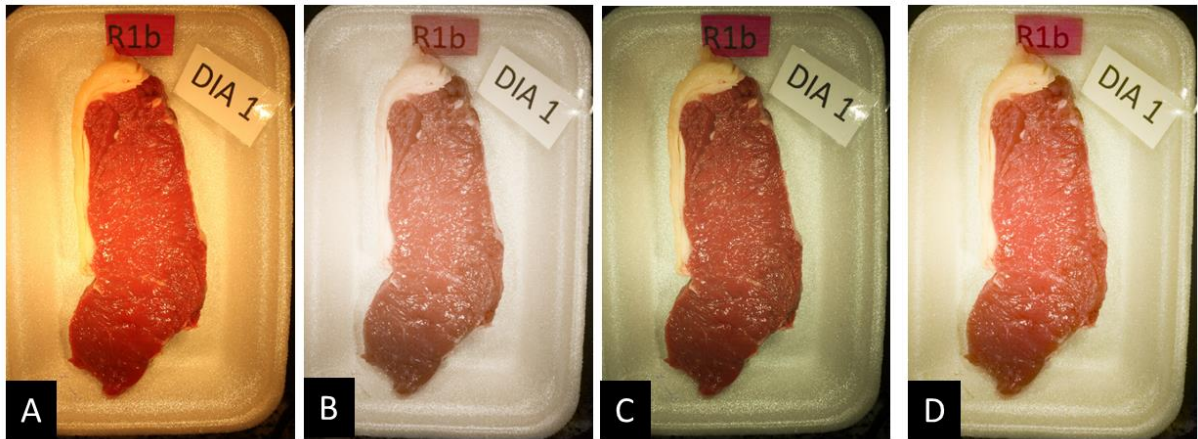


Figura 3. Fotos obtidas de um mesmo bife (padrão 100% Omb, após 24 h de oxigenação) por aparelhos diferentes e condições de calibração: câmera sem (A) e com (B) calibração; e celular sem (C) e com (D) calibração.

Para transformar as imagens em entradas da MLP, cada classe de pigmento e gordura teve seus 30 fragmentos segmentados em 400 seções de 10x10 pixels, totalizando 12.000 seções. Cada seção retangular de 10x10 pixels (100 pixels) foi transformada num vetor de 300 valores, sendo 100 valores para cada uma das componentes R, G e B (Figura 4).

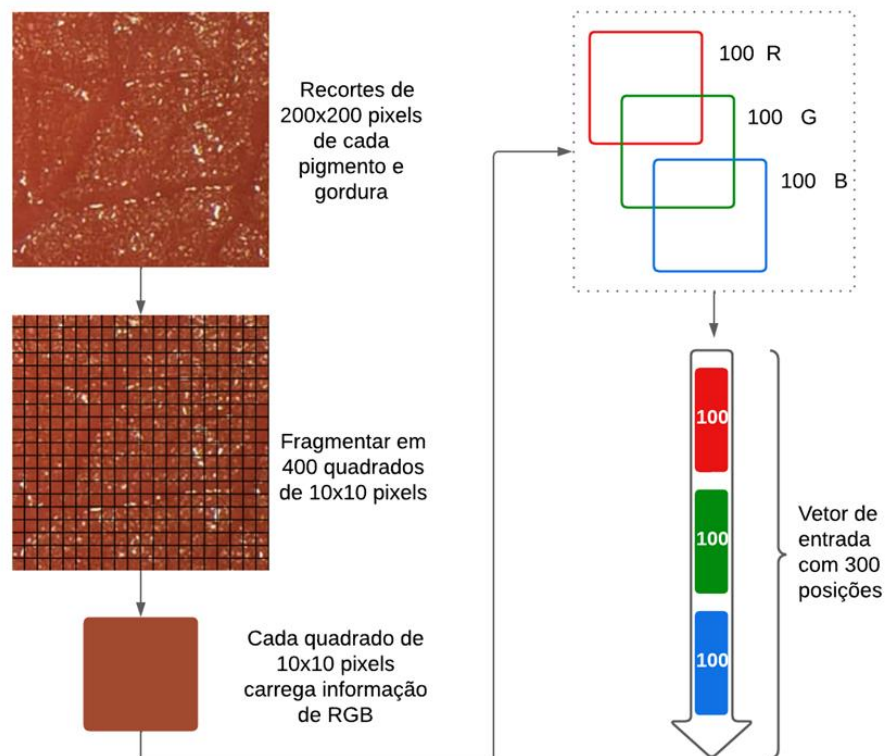


Figura 4. Ilustração do pré-processamento das imagens para MLP.

Para este primeiro banco de dados, utilizou-se a validação cruzada do tipo *k-fold*, ou seja, o conjunto de dados se dividiu em um número *k* de subconjuntos de dimensões similares, que utiliza a primeira dobra (*fold*) na primeira iteração para testar o modelo, e, o conjunto de dados restante (os demais *folds*) para treinar o modelo. A segunda dobra ajuda a testar o conjunto de dados e se repete até que o teste utilize *k* dobras, deste modo, todas as instâncias são utilizadas *k* – 1 vezes para treinamento e uma vez para teste (Alves, Tomé, Pereira, Villanoeva, & Silva, 2022). Sendo assim, o primeiro banco de dados foi categorizado em 10 subconjuntos, que alternavam entre 9 subconjuntos para treinamento e 1 para teste.

A MLP foi treinada de acordo com cada agrupamento das fotografias, ou seja, uma cópia foi treinada com as imagens da câmera calibrada e avaliou somente as imagens desse grupo e conseqüentemente ocorreu o mesmo para as demais condições de calibração. As redes neurais artificiais foram projetadas e implementadas utilizando a linguagem *Python no Google Colab*, utilizou as bibliotecas *sklearn* e *tensorflow*. O ajuste da rede e o número de neurônios foram determinados experimentalmente, optando-se pela rede de maior acurácia. A arquitetura da rede final possui 300 nodos de entrada, 152 neurônios na camada intermediária e 4 neurônios de saída.

O critério de parada empregado foi o número de épocas, em que o número máximo de 20 épocas foi utilizado. O algoritmo de treinamento foi o Adam, um método de otimização baseado no gradiente estocástica com poucos requisitos de memória, de simples implementação (Kingma *et al.*, 2017) e amplamente utilizado em problemas com grandes quantidades em termos de dados e parâmetros. A função de ativação utilizada na camada intermediária foi a “ReLU”, essa função de ativação aprende de forma adaptativa os parâmetros e melhora a precisão com um custo computacional extra insignificante (He, Zhang, Ren, & Sun, 2015). Na camada de saída, foi escolhida a função de ativação *softmax*, em que converte um vetor de *K* números reais em uma distribuição de probabilidade de *K* resultados possíveis, normalizando a saída de uma rede para uma distribuição de probabilidade sobre as classes de saída previstas. No contexto deste trabalho, usar a informação da probabilidade da saída da MLP é importante para considerar nas análises, caso haja misturas de pigmentos nos fragmentos de 10 x10 pixels. Em outras palavras, é uma forma de considerar na estimativa final de cada imagem inteira, a incerteza da MLP na classificação.

Após os resultados obtidos na primeira etapa de treinamento, uma segunda base de dados foi utilizada para testar a capacidade de generalização da MLP projetada. Esta segunda

base de dados foi composta por amostras (escolhidas pelo avaliador) que possuíam mais de um pigmento aparente na superfície do bife e aquelas que possuíam apenas um pigmento aparente (Figura 5). A estratégia nesta etapa foi verificar a capacidade da MLP de distinguir os diferentes pigmentos em um mesmo recorte de imagem. As dimensões das imagens eram de 1778 x 1148 *pixels* para as obtidas pela câmera fotográfica e de 1086 x 792 *pixels* para as imagens obtidas pelo celular e, desta forma, foi possível abranger quase a totalidade da matriz cárnea das fotografias.

O software encontra-se registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), sob número BR 51 2023 000048-5.

2.4 Validação do SVC

Para avaliação da IA, um experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com um fator em estudo (método de análise de cor objetiva) com três ferramentas para obtenção das formas químicas da mioglobina: colorímetro (método de Kryzwicki); IA por imagens da câmera fotográfica; e IA por imagens do celular. Seis bancos de dados foram usados neste experimento, com 198 imagens totais, sendo 42 para oxigenação, 70 para armazenamento, 20 para padrão DMb, 15 para padrão OMb e 45 para padrão MMb, totalizando, respectivamente, 594, 126, 210, 60, 45 e 135 unidades experimentais (U.E.). As repetições foram constituídas por amostras de bifes de contrafilé de até sete animais submetidas a diferentes tratamentos (como demonstrado pelos diferentes bancos de dados) para aumentar a variabilidade e, logo, a representatividade da cor da carne bovina.

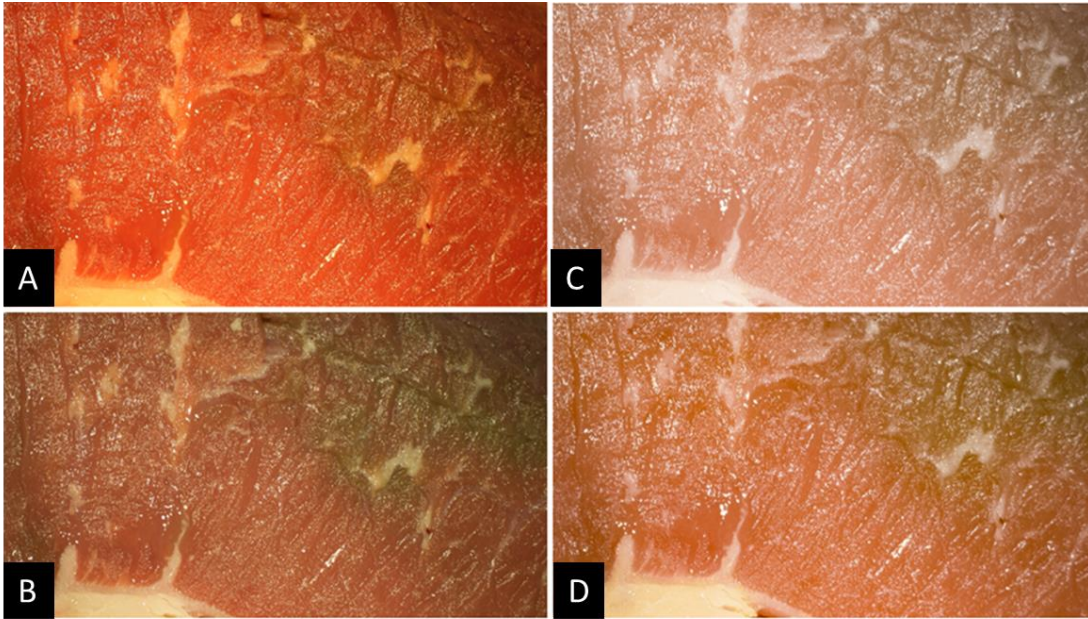


Figura 5. Recortes das fotografias de um mesmo bife (6 dias de armazenamento a 2°C) com mais de uma forma química da mioglobina aparente na superfície, obtidas por diferentes aparelhos e condições de calibração: câmera sem (A) e com (B) calibração; e celular sem (C) e com (D) calibração.

Em cada um dos seis bancos de dados, uma análise de estatística descritiva (média, erro padrão da média, coeficiente de variação, mínimo e máximo) foi realizada para cada forma química da mioglobina obtida por cada método (colorímetro, câmera e celular). Em seguida, o teste de ANOVA e, se necessário, separação das médias pelo teste de *Tukey* foram realizados para analisar o efeito do método sobre cada forma química. Por fim, análise de correlação de *Pearson* foi realizada para cada forma química da mioglobina entre o método colorímetro e os métodos câmera e celular, cujos coeficientes foram testados pelo teste *t de Student*. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software SAS*, versão 9.2 (*Statistical Analysis System - SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*), em nível de significância de 5%.

3 Resultados e discussão

3.1 Definição dos algoritmos (*Multi Layer Perceptron*)

Após o primeiro treinamento, as respostas da MLP foram coerentes com o que era esperado, sendo possível fazer a classificação dos pigmentos puros de acordo com o treinamento e o especialista. Na segunda inserção de dados, com pigmentos puros na superfície e também misturas de mais de um pigmento, as condições de câmera não calibrada e celular calibrado não foram adequadas (Tabela 1), uma vez que não foi capaz de detectar o principal pigmento (OMb) presente na superfície das fotos.

Tabela 1. Resultados da MLP de fragmentos (área 100 pixel²) da imagem de uma mesma amostra obtida com aparelhos e condições de calibração diferentes.

	MLP-Câmera		MLP-Celular	
	Não calibrado	Calibrado	Não calibrado	Calibrado
Pixels				
OMb	0	1421	1281	0
DMb	1431	111	1	1295
MMb	593	350	998	1120
LPD	600	742	361	225
Probabilidade				
OMb	0,00	0,53	0,44	0,00
DMb	0,54	0,05	0,02	0,49
MMb	0,22	0,13	0,37	0,42
LPD	0,24	0,29	0,16	0,09

OMb = oximioglobina; DMb = deoximioglobina; MMb = metamioglobina; LPD= gordura de cobertura

Os desempenhos da MLP da câmera calibrada e da MLP do celular não-calibrado são demonstrados na matriz de confusão (Tabela 2), que permite extrair métricas que auxiliam na avaliação dos modelos de classificação. Desta forma, optou-se por avaliar os algoritmos com MLP treinados com imagens da câmera calibrada e do celular não-calibrado na classificação das formas químicas da mioglobina. Como a MLP foi treinada para também reconhecer a gordura aparente (LPD), as proporções dos pigmentos na saída da MPL foram recalculadas para manter somente os pigmentos, removendo a probabilidade de LPD, conforme exemplificado na equação 1.

$$\%DMb_{ajustado} = \frac{(probDMb)}{(probDMb+probMMb+probOMb)} * 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Tabela 2. Matriz de confusão do *k-fold* treinado com imagens da câmera calibrada (MLP-Câmera) e do celular não-calibrado (MLP-Celular) de uma única classe.

Classe real	Classe Predita			
	OMb	DMb	MMb	LPD
MLP-Câmera¹				
OMb	96,83	0	0,1	16,35
DMb	0	94,14	10,36	0
MMb	0,2	5,87	89,05	0,58
LPD	2,97	0	0,49	83,06
MLP-Celular²				
OMb	91,05	0	0	20,37
DMb	0	89,82	10,48	0,03
MMb	0,12	10,18	89,45	0,18
LPD	8,83	0	0,07	79,42

OMb = oximioglobina; DMb = deoximioglobina; MMb = metamioglobina; LPD= gordura de cobertura

¹ Acurácia média do *k-fold* = $90,98 \pm 2,78$ % e do melhor *fold* = 94,84 %.

² Acurácia média do *k-fold* = $86,53 \pm 3,56$ % e do melhor *fold* = 90,40 %;

3.2 Avaliação dos padrões de referência

A cor da carne bovina é dependente da concentração de mioglobina no interior do músculo, mas o estado químico deste pigmento presente em maior concentração na superfície tem influência direta na tonalidade que a carne apresenta. Logo a estimativa das formas DMb, OMb e MMb é essencial para os estudos que avaliam a estabilidade de cor de carnes.

Foi verificada diferença significativa entre as leituras de cor (colorímetro) e imagens (MLP com câmera e com celular) das diferentes condições (avaliação direta do músculo recém cortado e indução por ditionito por diferentes tempos) na obtenção do padrão de 100% DMb (Tabela 3). Maiores proporções ($P < 0,05$) de DMb foram obtidas pela MLP-Câmera e pelo colorímetro, sendo que na MLP-Celular a presença de OMb foi superestimada.

Pelo colorímetro, o pigmento MMb foi contabilizado em uma alta proporção. Este parece ser um problema do método matemático de Krzywicki, que estima altas proporções deste pigmento em carnes, mesmo naquelas não totalmente oxidadas Artigo 1 (Hernández, Sáenz, Alberdi, & Diñeiro, 2015). Segundo Bueno (Artigo 1), isto se deve porque este método não utiliza curvas de referência, não se adaptando as características da amostra analisada. Apesar dos valores não diferirem estatisticamente do colorímetro, a estimativa da DMb pela MLP-Câmera foi afetada pela detecção de uma maior proporção de OMb, o que se deve,

provavelmente à maior proximidade da cor da DMb (vermelho púrpura) com a OMb (vermelho brilhante) do que com a MMb (marrom).

Tabela 3. Formas químicas da mioglobina (%) estimadas por diferentes métodos (colorímetro e análise de imagens MLP da câmera e celular) em contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos durante a obtenção do pigmento de DMb ($n = 20$).

Formas químicas	Média	EPM	CV	Mínimo	Máximo
Deoximioglobina (DMb)					
Colorímetro	79,76 ^a	3,18	8,91	71,00	86,12
MLP-Câmera	81,29 ^a	2,36	6,49	73,44	87,62
MLP-Celular	62,81 ^b	6,67	22,66	51,01	85,00
Metamioglobina (MMb)					
Colorímetro	11,19 ^a	1,64	32,78	6,82	16,69
MLP-Câmera	0,44 ^b	0,61	139,23	0,07	1,52
MLP-Celular	2,83 ^b	1,45	114,39	0,19	7,56
Oximioglobina (OMb)					
Colorímetro	9,05 ^b	2,25	55,73	2,95	16,69
MLP-Câmera	18,27 ^{ab}	2,14	26,19	12,30	25,05
MLP-Celular	34,36 ^a	7,50	48,84	10,15	47,79

EPM = erro padrão da média; CV = coeficiente de variação.

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras, para a mesma forma química da mioglobina diferem ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey.

Para os padrões de OMb, a maior ($P < 0,05$) estimativa foi da MLP-Câmera, com a estimativa da MLP-Celular não diferindo do colorímetro (Tabela 4). A MLP-Celular estimou uma maior proporção de DMb, enquanto a estimativa do colorímetro foi maior para a MMb. As estimativas da proporção das formas químicas nos padrões de MMb pelos métodos de visão computacional foram iguais, sendo a proporção de MMb próximo de 100% e muito superiores a estimativa feita pelo método tradicional do colorímetro (Tabela 5).

O colorímetro dispara um feixe de luz que penetra a superfície da carne até uma profundidade de 20 mm, segundo Girolami et al. (2013), fazendo com que os pigmentos além da metamioglobina sejam contabilizados na curva espectral, isto porque a camada de MMb não é superior a 6mm de profundidade. Evidentemente, as estimativas das formas químicas da mioglobina pelo método matemático de Krzywicki é certamente prática, porém, devido suas inconsistências, podem ser questionadas.

Tabela 4. Formas químicas da mioglobina (%) estimadas por diferentes métodos (colorímetro e análise de imagens MLP da câmera e celular) em contrafilés (*M. L. lumorum*) bovinos nas amostras padrão (oxigenação por 24 h e 1 dia) de OMb ($n = 15$).

Formas químicas	Média	EPM	CV	Mínimo	Máximo
Oximoglobina (OMb)					
Colorímetro	71,62 ^b	1,67	8,40	59,81	79,74
MLP-Câmera	87,51 ^a	5,01	20,64	37,11	99,08
MLP-Celular	71,74 ^b	4,77	23,95	34,48	89,25
Metamioglobina (MMb)					
Colorímetro	15,94 ^a	1,21	27,36	7,42	21,78
MLP-Câmera	0,11 ^b	0,05	167,94	0,00	0,66
MLP-Celular	0,94 ^b	0,24	92,10	0,21	3,49
Deoximioglobina (DMb)					
Colorímetro	12,44 ^b	2,11	61,26	5,25	32,40
MLP-Câmera	12,38 ^b	5,02	146,10	0,92	62,83
MLP-Celular	27,31 ^a	4,59	60,61	10,11	62,03

EPM = erro padrão da média; CV = coeficiente de variação.

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras, para a mesma forma química da mioglobina diferem ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 5. Formas químicas da mioglobina (%) estimadas por diferentes métodos (colorímetro e análise de imagens MLP da câmera e celular) em contrafilés (*M. L. lumorum*) bovinos durante a obtenção do pigmento de MMb ($n = 45$).

Formas químicas	Média	EPM	CV	Mínimo	Máximo
Metamioglobina (MMb)					
Colorímetro	62,75 ^b	1,62	16,12	50,20	76,92
MLP-Câmera	99,07 ^a	0,69	4,34	73,14	100,00
MLP-Celular	99,41 ^a	0,46	2,88	82,80	100,00
Oximoglobina (OMb)					
Colorímetro	22,46 ^a	1,51	41,86	8,58	37,33
MLP-Câmera	0,64 ^b	0,41	398,17	0,00	15,81
MLP-Celular	0,45 ^b	0,34	474,51	0,00	12,51
Deoximioglobina (DMb)					
Colorímetro	14,78 ^a	0,71	30,14	7,45	31,92
MLP-Câmera	0,29 ^b	0,28	619,84	0,00	11,06
MLP-Celular	0,14 ^b	0,12	543,23	0,00	4,69

EPM = erro padrão da média; CV = coeficiente de variação.

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras, para a mesma forma química da mioglobina diferem ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey.

3.3 Avaliação da base de dados

A estatística descritiva do banco de dados total é apresentada na Tabela 6. Este banco foi composto por todas as amostras de oxigenação e armazenamento, mas também todas as amostras na indução dos padrões de referência, incluindo as repetições, o que permitiu abranger toda a variabilidade da carne dos 7 animais do estudo.

Tabela 6. Estatística descritiva e correlação (r) dos dados de formas químicas da mioglobina (%) estimadas por diferentes métodos (colorímetro e análise de imagens MLP da câmera e celular) em contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos ($n = 198$).

Formas químicas	Média	EPM	CV	Mínimo	Máximo	r^1
Oximioglobina (OMb)						
Colorímetro	47,14	1,65	45,60	2,95	79,74	-
MLP-Câmera	53,54	3,09	75,11	0,00	99,47	0,82
MLP-Celular	46,91	2,67	79,93	0,00	91,92	0,80
Metamioglobina (MMb)						
Colorímetro	32,44	1,57	63,02	6,82	76,92	-
MLP-Câmera	32,18	3,40	137,43	0,00	100,00	0,92
MLP-Celular	36,33	3,37	120,41	0,19	100,00	0,92
Deoximioglobina (DMb)						
Colorímetro	20,40	1,26	80,35	5,25	86,12	-
MLP-Câmera	14,28	1,75	159,60	0,00	87,62	0,79
MLP-Celular	16,75	1,42	110,23	0,00	85,00	0,62

EPM = erro padrão da média; CV = coeficiente de variação.

¹ $P < 0,05$.

Os métodos possuem uma correlação alta e significativa, isso demonstra que os métodos possuem um comportamento geral similar, ou seja, os aumentos e decréscimos das proporções das formas químicas são acompanhados por todos, porém, as predições dos SVC parecem ser mais coerentes que o colorímetro devido às limitações dele, como a profundidade em que a luz penetra, os modelos matemáticos já descritos no Artigo 1. Essas variações do colorímetro ficam ainda mais evidentes em situações em que a mudança na proporção é esperada, como no caso da oxigenação e da descoloração do pigmento durante o armazenamento.

3.3.1 Acompanhamento da oxigenação

A estatística descritiva dos dados para o experimento de oxigenação é apresentada na Tabela 7. De forma geral, os métodos SVC tiveram uma alta correlação com a avaliação do colorímetro na estimativa das formas OMb e DMb, mas muito baixa para a forma química MMb. Conforme discutido anteriormente, a alta estimativa da MMb pelo método matemático de Kryzwicki é conflitante com o que é esperado do processo de oxigenação no período estudado, sendo entendido como um problema do método, por isso a baixa correlação, o que não deve ser visto como um ponto negativo para os SVC, mas sim como um ponto positivo, porque seus resultados são coerentes com a proporção de MMb e as demais formas químicas.

Tabela 7. Estatística descritiva e correlação (r) dos dados de formas químicas da mioglobina (%) estimadas por diferentes métodos (colorímetro e análise de imagens MLP da câmera e celular) em contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos durante a oxigenação (a 4°C) por 60 min ($n = 42$).

Formas químicas	Média	EPM	CV	Mínimo	Máximo	r^1
Oximioglobina (OMb)						
Colorímetro	56,63	3,75	37,84	2,95	79,74	-
MLP-Câmera	58,00	4,25	43,38	12,30	94,85	0,85
MLP-Celular	61,27	3,25	31,43	10,15	85,96	0,72
Metamioglobina (MMb)						
Colorímetro	11,35	0,51	26,83	6,82	16,63	-
MLP-Câmera	0,25	0,07	160,03	0,00	1,70	0,21
MLP-Celular	1,35	0,30	133,81	0,20	7,56	0,20
Deoximioglobina (DMb)						
Colorímetro	30,02	3,78	74,54	7,17	86,12	-
MLP-Câmera	41,75	4,27	60,45	4,49	87,62	0,87
MLP-Celular	37,39	3,07	48,60	16,68	85,00	0,75

EPM = erro padrão da média; CV = coeficiente de variação.

¹ $P < 0,05$.

Também de uma forma geral, todos os métodos descreveram um comportamento similar e esperado para o processo de oxigenação (Figura 7), em que a proporção de MMb é estável enquanto os teores de DMb e OMb reduzem e aumentam, respectivamente, de forma muito rápida. Isto ocorre como resultado da equalização do oxigênio na superfície da carne recém cortada, devido à alta afinidade da mioglobina pelo gás oxigênio (Jacob, 2020).

No entanto, as mudanças na OMb nos primeiros 30 min diferem de acordo com o método usado. As mudanças das proporções da forma química via método matemático de

Krzywicki é mais aguda no decaimento da DMb e no desenvolvimento da OMb. Apesar desta diferença, a oxigenação se estabiliza aos 30 min para todos os métodos, corroborando com as observações de outros autores para carne bovina Artigo 1 (Bueno, Ramos, & Ramos, 2015), de cordeiros (Alvarenga, Hopkins, Ramos, Almeida, & Geesink, 2019) e suína (Škrlep & Čandek-Potokar, 2007).

Outra importante diferença entre os métodos, diz respeito à proporção das formas químicas. Mesmo após 30 min de oxigenação todos os métodos estimaram uma proporção de OMb próxima de 70%. No caso do colorímetro, menores valores de OMb parecem ser devido a uma superestimativa da proporção de MMb nas carnes, visto que nenhuma MMb é induzida no processo de oxigenação em carnes frescas, com pouco tempo *post-mortem*. Maiores valores na estimativa da MMb do que o esperado, também foi relatado no Artigo 1. Já para os métodos de SVC, os baixos valores parecem ser devidos à uma maior estimativa na proporção de DMb, por serem pigmentos de tons mais aproximados a OMb, e, uma forma de minimizar esta diferença seria acrescentar mais imagens de OMb com 60 minutos de oxigenação, desta forma, aumentando a capacidade de generalização das SVC de acordo com a variabilidade que este pigmento pode apresentar.

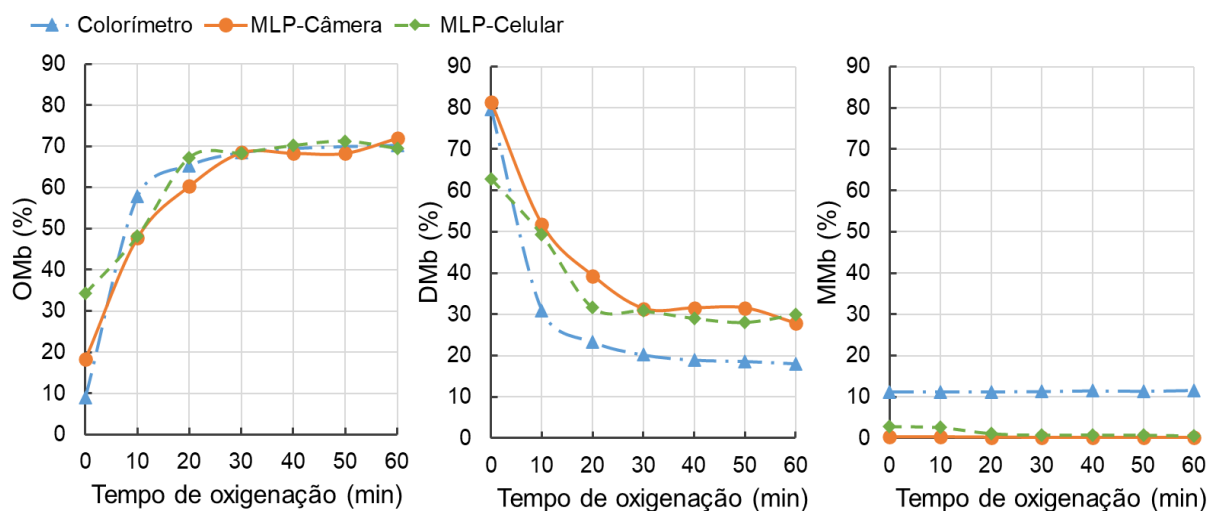


Figura 7. Efeito dos métodos de avaliação (Colorímetro, MLP-Câmera e MLP-Celular) das formas químicas da mioglobina na proporção de deoximioglobina (DMb), oximioglobina (OMb) e metamioglobina (MMb) durante a oxigenação (a 4 °C) de músculo (*L. lumbarum*) bovinos.

3.4.2 Acompanhamento durante o armazenamento refrigerado

A estatística descritiva dos dados durante o armazenamento em *dipslay* refrigerado é apresentada na Tabela 8. Ambos os métodos SVC tiveram uma alta correlação com a avaliação do colorímetro para as três formas químicas, embora uma maior correlação foi observada no método MLP-Câmera para as formas OMb e DMb.

Durante o armazenamento da carne bovina em ambiente rico em oxigênio, o processo de oxidação do pigmento de mioglobina ocorre gradativamente, com conseqüente aumento no teor de MMb, afetando a cor e aparência da carne e determinando a sua vida útil (Mancini, Ramanathan, Hunt, Kropf, & Mafi, 2022). Da mesma forma que observado durante a oxigenação da carne, o comportamento das formas químicas da mioglobina foi similar para os diferentes métodos, mas os valores absolutos divergiram, especialmente entre os métodos MLP-Câmera e o colorímetro (Figura 8).

Tabela 8. Estatística descritiva e correlação (r) dos dados de formas químicas da mioglobina (%) estimadas por diferentes métodos (colorímetro e análise de imagens MLP da câmera e celular) em contrafilés (*M. L. lumborum*) bovinos durante o armazenamento refrigerado (a 2°C) por 8 dias ($n = 70$).

Formas químicas	Média	EPM	CV	Mínimo	Máximo	r^1
Oximioglobina (OMb)						
Colorímetro	59,56	1,50	19,94	20,62	77,36	-
MLP-Câmera	86,13	2,63	24,21	18,60	99,47	0,88
MLP-Celular	70,10	2,60	29,49	14,49	91,92	0,66
Metamioglobina (MMb)						
Colorímetro	26,59	0,84	25,25	15,11	42,98	-
MLP-Câmera	6,63	1,57	187,41	0,00	63,29	0,71
MLP-Celular	14,29	2,53	140,80	0,19	82,26	0,74
Deoximioglobina (DMb)						
Colorímetro	13,80	1,43	82,62	5,25	64,27	-
MLP-Câmera	7,23	2,20	241,49	0,20	80,99	0,96
MLP-Celular	15,62	1,72	87,24	2,65	62,03	0,66

EPM = erro padrão da média; CV = coeficiente de variação.

¹ $P < 0,05$.

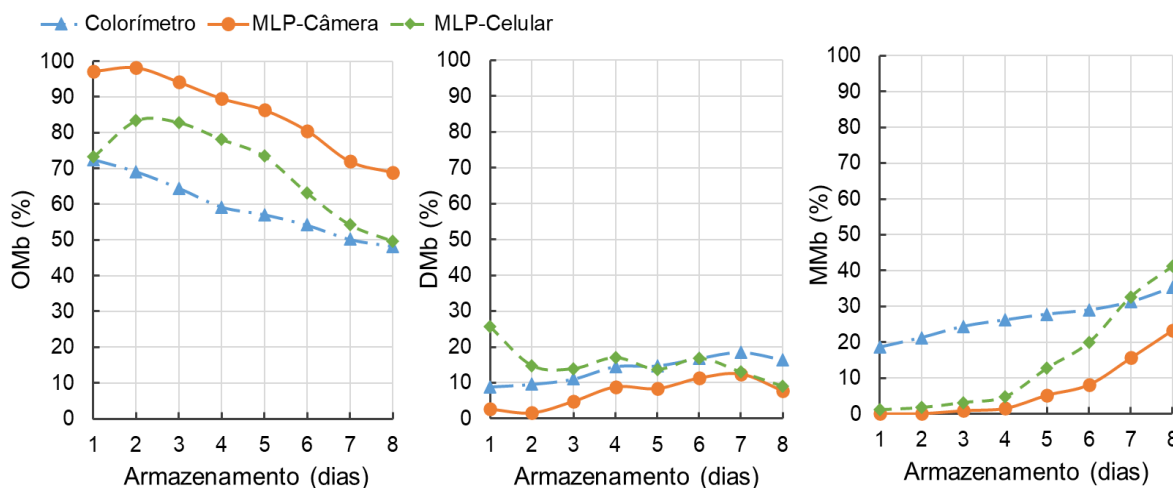


Figura 8. Efeito dos métodos de avaliação (Colorímetro, MLP-Câmera e MLP-Celular) das formas químicas da mioglobina na proporção de deoximioglobina (DMb), oximioglobina (OMb) e metamioglobina (MMb) durante o armazenamento (a 2 °C) de músculo (*L. lumbrorum*) bovinos.

O método matemático de Krzywicki pelo colorímetro detecta o aumento gradual da oxidação, porém já com uma proporção alta de MMb desde o primeiro dia de armazenamento. O surgimento da MMb inicia-se em camadas inferiores da carne (Jacob, 2020), cuja reflectância o colorímetro é capaz de detectar pela penetração da luz na matriz proteica, entre 15-20 mm de profundidade (Girolami et al., 2013). Porém essa formação inicial não é detectada por imagens de vídeo, uma vez que estas registram a cor da carne formada em uma camada de aproximadamente de 5 mm (Girolami et al., 2013). Isto explica as diferenças nas proporções de MMb detectada por estes métodos. Outra consideração importante é que a oxidação ocorre de maneira desigual na superfície da carne, podendo haver áreas mais oxidadas do que outras. A análise pelo colorímetro tem muita dificuldade de detectar de forma consistente estas variações. Assim, interpretar os limites de aceitação do consumidor em termos de valores de %MMb calculados por colorímetros devem ser sempre feitos com cautela (Hernández Salueña et al., 2019), pois as estimativas podem ser diferentes das observadas na superfície pelos consumidores.

Considerando os limites descritos por Hood and Riordan (1973), em que as vendas podem cair até 40% quando se tem 10% de MMb e que o consumidor passa a rejeitar a carne quando teores maiores que 20% estejam presentes, as amostras já seriam rejeitadas no primeiro

dia pelos dados do colorímetro. Para o SVC, os bifes começariam a ser identificados e rejeitados a partir do quarto dia para o MLP-Celular e no quinto dia para MLP-Câmera.

As proporções estimadas pelo SVC são mais coerentes com as mudanças observadas na cor durante o armazenamento em *display* do que as estimadas pelo colorímetro. No primeiro dia de armazenamento, as carnes estão bastante oxigenadas, com a superfície integralmente vermelha e uniforme. Os níveis de OMb são altos (próximo a 100%) e começam a diminuir gradualmente ao longo dos dias quando estimados pelos SVC. Mesmo no MLP-Celular, em que há um aumento no percentual de OMb entre o primeiro e segundo dia, o comportamento pode ser justificado pelas diferenças na taxa de consumo de oxigênio (TCO) da carne. A TCO pode ser descrita como a competição entre a mioglobina e a mitocôndria pelo oxigênio, em que determina a penetração do oxigênio sob a superfície da carne, e com a evolução temporal, a competição é mais branda pelo esgotamento do mecanismo, dos substratos enzimas e coenzimas, conseqüentemente diminui a TCO, aumentando a profundidade do O₂ na superfície da carne (Cardoso et al., 2019; McKenna, Mies, Baird, Pfeiffer, Ellebracht, & Savell, 2005).

Apesar dos indicativos de que os SVCs têm maior potencial de descrever a cor de carne as mudanças durante o armazenamento, é preciso fazer uma análise sensorial para relacionar os dados de percentual dos pigmentos com a cor e aparência percebidas. Em sistemas de display, as carnes tendem a exsudar ao decorrer do tempo e isso altera a coloração superficial, seja pela oxidação do pigmento ou pelo escurecimento da cor da carne oriunda desta exsudação, tornando a carne mais escura (Aroeira et al., 2017) e também podendo influenciar na aceitação do consumidor.

4. Conclusões

O campo da visão computacional tem demonstrado ser promissor como novos métodos de avaliação de qualidade de carne bovina, e utilização de uma inteligência artificial como uma *Multi Layer Perceptron* é pioneira para a classificação dos pigmentos da superfície da carne bovina. Os resultados dos SVC demonstraram conseguir acompanhar os processos de oxigenação e oxidação dos pigmentos, assim como reconhecer e interpretar as amostras padrões das formas químicas. Em alguns casos, inclusive há uma superioridade na classificação, pois esse método leva em consideração o que é visto na superfície da carne bovina, diferentemente do que é obtido pelo colorímetro devido a penetração do feixe de luz na matriz cárnea. Outro ponto relevante dos SVC, é a análise criteriosa, pois é feita a leitura da superfície a cada área

de 100 pixels, considerando toda heterogeneidade das amostras, em contrapartida, as metodologias tradicionais leem entre 3 a 5 pontos e a média deles representam o bife como um todo. O método de Krzywicki, embora acompanhe as mudanças dos pigmentos, alguns dados são sub ou superestimados, sendo uma falha do método por não obter as curvas espectrais das formas químicas em 100% e isto implica em não levar em consideração a particularidade de cada animal estudado.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Federal de Lavras – UFLA, ao Departamento de Ciência dos Alimentos Federal – UFLA, ao Departamento de Automática -UFLA, a Cecília Aparecida Santos Silva pelo desenvolvimento da MLP e às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro para condução desta pesquisa.

Referências

- Alvarenga, T.I.R.C., Hopkins, D.L., Ramos, E.M., Almeida, A.K., & Geesink, G. (2019). Ageing-freezing/thaw process affects blooming time and myoglobin forms of lamb meat during retail display. *Meat Science*, *153*, 19-25.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.02.016>
- Alves, R.O.R., Tomé, O.C., Pereira, P.C., Villanoeva, C.N.B.C., & Silva, V.m. (2022). Artificial neural networks in the prediction of fraud in integral milk powder by adding whey powder. *Ciência Rural*, *52*(4), e20210109. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210109>
- AMSA. (2012). *Meat Color Evaluation Guide*. Champaign, Il: American Meat Science Association (AMSA).
- AMSA. (2015). *Research Guidelines for Cookery, Sensory Evaluation, and Instrumental Tenderness Measurements of Meat* (2nd ed.). Champaign: American Meat Science Association (AMSA).
- Aroeira, C.N., Torres Filho, R.A., Fontes, P.R., Ramos, A.L.S., Gomide, L.A.M., Ladeira, M.M., & Ramos, E.M. (2017). Effect of freezing prior to aging on myoglobin redox forms and CIE color of beef from Nellore and Aberdeen Angus cattle. *Meat Science*, *125*, 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.11.010>

- Brosnan, T., & Sun, D.-W. (2004). Improving quality inspection of food products by computer vision—a review. *Journal of Food Engineering*, *61*(1), 3-16.
[https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00183-3](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00183-3)
- Bueno, L.O., Ramos, A.L.S., & Ramos, E.M. (2015). Influence of temperature and oxygenation time on the fresh beef color (in portuguese). *Revista Higiene Alimentar, special ed.*, 1933 - 1940.
- Cardoso, G.P., Andrade, M.P.D., Rodrigues, L.M., Massingue, A.A., Fontes, P.R., Ramos, A.L.S., & Ramos, E.M. (2019). Retail display of beef steaks coated with monolayer and bilayer chitosan-gelatin composites. *Meat Science*, *152*, 20-30.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.02.009>
- Cardoso, G.P., Dutra, M.P., Fontes, P.R., Ramos, A.L.S., Gomide, L.A.M., & Ramos, E.M. (2016). Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail display. *Meat Science*, *114*, 85-94.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.012>
- Girolami, A., Napolitano, F., Faraone, D., & Braghieri, A. (2013). Measurement of meat color using a computer vision system. *Meat Science*, *93*(1), 111-118.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.08.010>
- Haykin, Simon. *Neural Networks and Learning Machines* (3rd ed.). Hoboken, New Jersey: Prentice Hall, 2008. 906 p.
- He, K., Zhang, X., Ren, S., & Sun, J. (2015). Delving deep into rectifiers: Surpassing human-level performance on imagenet classification. In *3rd International Conference on Learning Representations (ICLR)*, (pp. arXiv:1502.01852). San Diego, CA, USA.
- Hernández, B., Sáenz, C., Alberdi, C., & Diñeiro, J.M. (2015). Comparison between two different methods to obtain the proportions of myoglobin redox forms on fresh meat from reflectance measurements. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(12), 8212-8219. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1917-x>
- Hernández Salueña, B., Sáenz Gamasa, C., Diñeiro Rubial, J.M., & Alberdi Odriozola, C. (2019). CIELAB color paths during meat shelf life. *Meat Science*, *157*, 107889.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107889>
- Hood, D.E., & Riordan, E.B. (1973). Discolouration in pre-packaged beef: measurement by reflectance spectrophotometry and shopper discrimination. *International Journal of*

- Food Science & Technology*, 8(3), 333-343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1973.tb01721.x>
- Jacob, R. (2020). Implications of the variation in bloom properties of red meat: A review. *Meat Science*, 162, 108040. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108040>
- Jose, C., & McGilchrist, P. (2022). Ageing as a method to increase bloom depth and improve retail colour in beef graded AUS-MEAT colour 4. *Meat Science*, 183, 108665. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108665>
- Krzywicki, K. (1979). Assessment of relative content of myoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin at the surface of beef. *Meat Science*, 3(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(79\)90019-6](https://doi.org/10.1016/0309-1740(79)90019-6)
- Mancini, R.A., & Hunt, M.C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71(1), car100-121. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.03.003>
- Mancini, R.A., Ramanathan, R., Hunt, M.C., Kropf, D.H., & Mafi, G.G. (2022). Interrelationships between visual and instrumental measures of ground beef color. *Meat and Muscle Biology* 6(1 (14040)), 1-8. <https://doi.org/10.22175/mmb.14040>
- McKenna, D.R., Mies, P.D., Baird, B.E., Pfeiffer, K.D., Ellebracht, J.W., & Savell, J.W. (2005). Biochemical and physical factors affecting discoloration characteristics of 19 bovine muscles. *Meat Science*, 70(4), 665-682. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.02.016>
- Piao, D., Denzer, M.L., Mafi, G., & Ramanathan, R. (2022). Daily quantification of myoglobin forms on beef Longissimus lumborum steaks over 7 days of display by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Meat and Muscle Biology* 5(1 (42)), 1-14. <https://doi.org/10.22175/mmb.12562>
- Ramos, E.M., & Gomide, L.A.M. (2017). *Meat quality assessment: fundamentals and methodologies (in portuguese)* (2nd ed.). Viçosa, MG, Brazil: Editora UFV.
- Škrlep, M., & Čandek-Potokar, M. (2007). Pork color measurement as affected by bloom time and measurement location. *Journal of Muscle Foods*, 18, 78-87. <https://doi.org/10.1111/J.1745-4573.2007.00067.X>

APÊNDICE A – Condução das análises utilizando os SVC

Legenda: Condução da análise através do Sistema de aquisição de imagem utilizando a câmera (à esquerda) e o celular (à direita).

APÊNDICE B- Sumário e Registro da MLP no INPI

BRASIL Acesso à informação Participe Serviços Legislação Canais

Instituto Nacional da
Propriedade Industrial
Ministério da Economia

Consulta à Base de Dados do INPI

[Início | Ajuda?]

» Consultar por: Pesquisa Base Programas | Finalizar Sessão 1/1

Programa de Computador

Nº do Pedido: BR 51 2023 000048 5
 Data do Depósito: 06/01/2023
 Linguagem: PYTHON
 Campo de Aplicação: BL-07 / FQ-16 / IN-02
 Tipo Programa: IA-01 , IT-02 , TC-03 , TC-04 , UT-04
 Título: Meat Mb Redox
 Nome do Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
 Nome do Autor: CECÍLIA APARECIDA SANTOS SILVA / DANTON DIEGO FERREIRA / EDUARDO MENDES RAMOS / LETHICIA OLIMPIO BUENO
 Nome do Procurador:

Petições

Pgo	Protocolo	Data	Img	Serviço	Cliente	Delivery	Data
✓	870230001567	06/01/2023	-	730	UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS		-

Publicações

RPI	Data RPI	Despacho	Img	Complemento do Despacho
2714	10/01/2023	730	-	

Dados atualizados até 10/01/2023 - Nº da Revista: 2714

Rua Mayrink Veiga, 9 - Centro - RJ - CEP: 20090-910



Legenda: *print screen* do site do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) com o número de registro do software, registrado em 06/01/2023.

```
Model: "sequential_3"
-----
Layer (type)                Output Shape                Param #
-----
dense_1 (Dense)             (None, 152)                 45752
dense_2 (Dense)             (None, 4)                   612
-----
Total params: 46,364
Trainable params: 46,364
Non-trainable params: 0
```

Legenda: Sumário da MLP