

Estimación de la madurez ósea en canales de bovino por fluorescencia diferencial

Estimating bone maturity in beef carcasses through differential fluorescence

Gastón R. Torrescano Urrutia^a, Armida Sánchez Escalante^a, Martín Gustavo Vásquez Palma^b, Marco Antonio Valenzuela Escárcega^b, Ricardo Paz Pellat^b, Dino A. Pardo Guzmán^b

RESUMEN

Actualmente, el análisis de clasificación de calidad de la canal depende en gran medida de la edad del animal; sin embargo, el patrón en México es demasiado impreciso, pues sólo requiere identificar si éste es menor o mayor a 30 meses. Esta falta de precisión genera la necesidad de sistemas objetivos para medir la madurez fisiológica. El propósito de esta investigación fue estimar de manera precisa el porcentaje de osificación del cartílago en la 12^{ava} costilla, como un indicador de madurez ósea en canales de bovino, utilizando un esquema electrónico por visión artificial. En el esquema desarrollado se aprovecha la mayor fluorescencia que genera el cartílago, en comparación con la del hueso y la grasa, sobresaliendo claramente la región del cartílago, desarrollando algoritmos de procesamiento de imágenes para analizar esta región, y estimar de manera precisa el porcentaje de osificación, y por tanto la edad fisiológica de la canal. El sistema de visión artificial desarrollado permitió evaluar la madurez ósea de una canal en menos de un segundo, y la información obtenida fue utilizada para establecer la clasificación electrónica de la canal en menos de cinco segundos.

PALABRAS CLAVE: Madurez, Osificación de cartílagos, Bovino, Imágenes fluorescentes.

ABSTRACT

At present, carcass grading is dependent to a great degree on age of the animal. However, in México standards are vague on this matter, because the only requirement is stating if the animal is younger or older than 30 mo. This vagueness is the source of a need of developing objective systems for determining physiological maturity. Therefore, the purpose of the present study was estimating with great accuracy ossification of the cartilage in the 12th rib, as an indicator of bone ossification in bovine carcasses, by means of an electronic pattern obtained through artificial vision. In the model developed to this end, better use of fluorescence generated by the cartilage is made, in comparison to both bone and fat, and as a result the cartilage area stands out clearly, and by developing image processing algorithms for analyzing it, ossification percentage can be estimated with accuracy, and consequently, carcass physiological age. The artificial vision system developed in the present study allows evaluating bone maturity in a carcass in less than one second and data obtained is used for establishing carcass electronic grading in less than five seconds.

KEY WORDS: Maturity, Cartilage ossification, Bovines, Fluorescent image.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a los criterios de clasificación de canales en México y Estados Unidos, es posible hacer una estimación de la edad fisiológica del animal mediante determinaciones visuales

INTRODUCTION

In accordance with carcass grading criteria in both México and the USA, it should be possible to estimate physiological age of animals visually by trained staff. In México, beef carcasses are graded

Recibido el 17 de junio de 2011. Aceptado el 2 de agosto de 2011.

^a Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, AC), Carretera a la Victoria km 0.6, Hermosillo, Sonora. México. Tel. +52 (662) 2892400, Fax. +52 (662) 2800421. gtorrescano@ciad.mx. Correspondencia al primer autor.

^b Centro de Investigación y Desarrollo en Ingeniería Avanzada, S.A. de C.V.

realizadas por personal técnico designado por las dependencias gubernamentales. En México, la clasificación de la carne de bovino en canal se rige por la norma NMX-FF-078-SCFI-2002⁽¹⁾, que tiene como objetivo establecer la calidad para asignación de mayor precio a mayor calidad, considerando diferentes criterios o atributos, siendo estos: madurez, conformación, color de la grasa y de la carne, distribución de la grasa subcutánea y perirrenal; y a conveniencia del mercado, se pueden considerar el marmoleo y la firmeza de la carne. Bajo este esquema, en México, el grado de calidad de la canal depende primeramente de la madurez ósea, y se clasifica de acuerdo con grados básicos de calidad en Suprema, Selecta, Estándar, Comercial y fuera de clasificación.

La norma de clasificación del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés)⁽²⁾, asigna al marmoleo un peso específico muy importante, y junto con la madurez ósea definen el grado de calidad de una canal de bovino⁽²⁾. Un contenido de grasa intramuscular abundante en animales menores de 30 meses se considera un grado de calidad de primera (Prime, en inglés); y para el resto, ésta dependerá del grado de marmoleo (de modesto a nulo) sin considerar variaciones en el grado de madurez.

Así, en ambos sistemas de clasificación la madurez ósea de la canal es importante. Primero, por su valor comercial debido al grado de madurez fisiológica; y segundo, por la importancia de la seguridad alimentaria, derivado de las enfermedades asociadas a la edad de los animales, como es la encefalopatía espongiiforme bovina.

Las metodologías disponibles para medir el grado de madurez de la canal son subjetivas, haciéndolas imprecisas y lentas, ya que consideran aspectos como la osificación en vértebras sacras, lumbares y torácicas, además del color del cuerpo de las vértebras y costillas⁽¹⁾, generando dificultad para medirlos en la línea de producción.

La visión artificial es una técnica relativamente nueva, muy importante en el sector agroalimentario

in accordance with rule NMX-FF-078-SCFI-2002⁽¹⁾, whose object is to set standards that allow a price:quality relationship, that is to say, higher price for better quality, taking into account diverse criteria or attributes, like maturity, conformation, fat and meat color, subcutaneous and perirenal fat distribution, and considering market demand, meat marbling and firmness. Therefore, in México beef carcass quality is dependent first on bone maturity and is accordingly graded as Suprema, Selecta, Standard, Commercial and Out of Grade.

In the US, USDA awards marbling great weight and together with bone maturity define beef carcass quality⁽²⁾. A high content of intramuscular fat in animals less than 30 mo of age is graded as Prime quality, and for the remainder, the amount of marbling (from modest to null) will determine grade quality not taking into account degree of maturity.

Therefore, in both grading systems bone maturity is an important factor, primarily due to its commercial value due to physiological maturity and secondly because of food safety issues, due to diseases associated to age, as the bovine spongiform encephalopathy.

Available methodologies for measuring carcass maturity are subjective, therefore slow and inaccurate, as they take into account sacral, lumbar and thoracic vertebrae ossification and rib and vertebrae body color, too⁽¹⁾, being difficult to measure in the production line. Artificial vision is a relatively new technique, very important to perform assessments objectively, hygienically, quickly and automatically in quality grading and control in the agrifood industry⁽³⁾. With this technique rib-eye area⁽⁴⁾, meat and fat color⁽⁵⁾, sarcomere length⁽⁶⁾ and marbling⁽⁷⁾ can be assessed with accuracy but with relative success.

Ossification intensity, reflects transformation of cartilage into bone, therefore, greater ossification is a sure indicator of greater age, besides greater red color in cartilage at vertebra apophysis. Ossification percentage can be determined by

(procesos de clasificación y control de calidad), para realizar una evaluación objetiva, automática, rápida e higiénica⁽³⁾. Así, mediante esta técnica puede estimarse con precisión, pero con éxito limitado, el área del ojo de la costilla⁽⁴⁾, el color de la carne y grasa⁽⁵⁾, la longitud del sarcómero⁽⁶⁾, y la grasa intramuscular⁽⁷⁾.

El grado de osificación, es el grado en que el cartílago se va transformando en hueso; así, a mayor osificación mayor edad y mayor grado de coloración roja en el cartílago de las puntas de las apófisis vertebrales. Para determinar el porcentaje de osificación con un dispositivo electrónico se requiere de una correcta identificación del área del cartílago, por medio del procesamiento de imágenes. Sin embargo, se presenta un problema para identificar el cartílago, ya que alrededor de éste existen regiones con hueso o grasa, cuyo color puede ser similar, generando una confusión al equipo de visión artificial para distinguir al cartílago de otros componentes de sus alrededores.

En estudios realizados por varios grupos de investigación sobre las propiedades ópticas del cartílago expuesto a radiación ultravioleta o infrarroja, se han obtenido nuevas posibilidades para identificar de manera precisa el área del cartílago^(4,8-13). A diferencia de la grasa y hueso, el cartílago exhibe una fuerte fluorescencia cuando éste es excitado mediante radiación ultravioleta, con picos de emisión a 380 y 466 nm⁽¹³⁾. Este comportamiento se asocia a la fluorescencia de los diferentes tipos de colágeno del cartílago^(10,13-15), y más específicamente a la emitida por colágenos del tipo I, III y V del músculo *Longissimus dorsi*, como resultado de la foto excitación a 332 y 380 nm⁽⁴⁾; aunque el espectro de emisión de los colágenos tipo I y III es similar al del tejido perimisial en el *Longissimus dorsi*.

En tanto que el color de la grasa, hueso y cartílago pueden ser muy similares, los dispositivos de visión artificial tradicionales enfrentan grandes dificultades para separar la región del cartílago del hueso y grasa adyacentes, por lo que en el

means of an electronic device but for this, a precise identification of cartilage area through image processing is required. However, cartilage identification is not easy, because bone and fat areas surrounding it can show comparable color and can confuse the measuring device.

In studies carried out on optical properties of cartilage exposed to either ultraviolet or infrared radiation, new possibilities for identifying cartilage area have been found^(4,8-13). Unlike bone and fat, connective tissue shows strong fluorescence when excited with ultraviolet radiation, at 380 and 466 μm emission peaks⁽¹³⁾. This performance is associated to fluorescence of the different types of collagen found in connective tissue^(10,13-15) and more specifically type I, III and V collagen in the *Longissimus dorsi* muscle, in response to photo excitation at 332 and 380 nm⁽⁴⁾, although collagen type I and III emission spectrum is similar to that of *Longissimus dorsi* perymisial tissue.

As fat, bone and cartilage can show very little difference in color, traditional artificial vision devices face great difficulty in separating cartilage from adjacent bone and fat areas, the purpose of the present study was to research differential traits in photoluminescence of these components for building an electronic device and developing an image processing algorithm for estimating bone maturity objectively.

MATERIALS AND METHODS

Image capture

Images were captured by means of a Canon EOS 30D SLR AF/AE digital camera (Canon Inc., Tokyo, Japan) provided with white and black balance, temperature color compensation, RGB primary color filters and 8.2 megapixel CMOS sensor. For control and automation of image capture a Canon Digital camera Software Development Kit (CD-SDK) version 7.3 was bought from Canon. This kit is a library that helped build an interface with the digital camera, where 20 images per carcass were captured. For image

presente trabajo se estudiaron las características diferenciales en la fotoluminiscencia de estos tres componentes para la construcción de un dispositivo electrónico, y el desarrollo de algoritmos de procesamiento de imágenes para estimar la madurez ósea de manera objetiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura de imágenes

La captura de imágenes se llevó a cabo utilizando una cámara digital Canon EOS 30D, SLR AF/AE (Canon Inc., Tokio, Japón), con balance de blancos y compensación en la temperatura de color, filtros de color primario tipo RGB y sensor CMOS de 8.2 mega píxeles. A efecto de controlar y automatizar el proceso de captura de imágenes, se adquirió el CD-SDK (Canon Digital camera Software Development Kit) versión 7.3 proporcionado por Canon. El CD-SDK es una librería que facilitó la construcción de una interfase con la cámara digital, donde se capturaron 20 imágenes por canal.

Para la captura de imágenes se desarrolló un software que tiene un módulo de visualización, que consta de tres filtros de media y de mediana para la eliminación de ruido, y un filtro creado especialmente para este proyecto, el cual ajusta los canales RGB (red, green, blue) a una amplitud y un "offset" dados. Con estos filtros se busca eliminar defectos de la imagen provocados por fallas del sensor de la cámara, que aparecen como picos de intensidad muy pronunciados. Estos picos se eliminan promediando la intensidad de los píxeles en su vecindad (filtro de media); si la variancia es mayor a un valor predeterminado, se utilizará el valor central de los datos cercanos (filtro de mediana), lo cual tiene la ventaja de que el valor final del píxel es un valor real presente en la imagen, y no un promedio, y de este modo se reduce el efecto borroso que tienen las imágenes debido al uso del filtro de media. La ventana principal es MDI, es decir, soporta varios documentos abiertos a la vez, por lo tanto se visualizan tantas imágenes como se desee.

capture software containing a visualization module was developed specifically for this project for noise elimination, made up by three average and median filters, which adjusts the RGB (red, green and blue) channels at set amplitude and offset values. The object of these filters is elimination image defects due to faults of camera sensors, which come out as very strong intensity peaks. These peaks can be eliminated by smoothing the intensity of nearby pixels (average pixels), and if variance is greater than a predetermined value, a value central to nearby data (average filter) is used. This has the advantage that pixel final value corresponds to one already present in the image, and not to an average, reducing blurring as happens when average filters are used. The main window is MDI, that is to say, it can carry several open documents, and so many images can be seen at the same time.

This module has two windows, RGB View and Phase View, that allow access to the software menu, which deploy data on the active image in real time, showing RGB channels and the phase of a line selected in the image. Lines are selected by pressing the button with the chosen function on the image, and then a small box corresponding to the area being analyzed will appear.

Light sources were diverse. Several light emission diode (LED) sources were built, providing different spectrum ranks, with electroluminescent diodes, white (camera flash), blue-UV, blue, green, yellow and red, with values around 400, 440, 540, 570 and 640 nm, respectively. A 6 w source with 380-390 nm emission peaks was used for fluorescence tests.

Image processing

Captured images were analyzed through algorithms created as part of the present study, and other standard image processing algorithms, too, for conversion to binary images. Threshold adjustments were applied to images for identifying contours, through Hough's rapid transfer, and later presenting those images in different color spaces, segmenting by means of diverse methods, as k-means (with

Este módulo cuenta con dos ventanas que permiten el acceso al menú del software, las cuales despliegan información acerca de la imagen activa en tiempo real, RGB View y Phase View, que muestran los canales RGB y la fase de una línea seleccionada en la imagen. La selección de línea se realiza pulsando el botón con la función deseada sobre la imagen, con lo cual aparecerá un pequeño recuadro correspondiente al área de análisis.

La fuente de iluminación fue variada. Se prepararon diferentes fuentes de iluminación LED (light emission diode) en varios rangos espectrales con diodos electroluminiscentes: luz blanca (flash de la cámara), azul-UV, azul, verde, amarilla y roja, con valores alrededor de los 400, 440, 540, 570 y 640 nm respectivamente. Para las pruebas de fluorescencia se utilizó una fuente de 6 watts con pico de emisión en los 380-390 nm.

Procesamiento de imágenes

Para analizar las imágenes capturadas se utilizaron los algoritmos generados como parte de este proyecto y otros algoritmos estándares de procesamiento de imágenes con el fin de convertirlas en imágenes binarias. A las imágenes se les aplicaron ajustes de umbral con el propósito de identificar contornos, para lo que se utilizó la transformada rápida de Hough, para posteriormente presentar las imágenes en diferentes espacios de color, segmentando por métodos como el k-means (con diferentes números de capas) o entropía máxima, teoría de grafos, análisis de los niveles de color en sus tres dimensiones, cambios a escala de grises, clasificación de partículas para identificar elementos con base en su redondez y tamaño, análisis de textura, manipulación del histograma en escala de grises y color; de manera que el algoritmo resultante para procesar las imágenes fuera una combinación optimizada de varios algoritmos de visión artificial.

Pruebas en campo

Las pruebas de campo se realizaron en 10 canales de bovino procesadas en una planta de sacrificio,

different number of layers), or maximum entropy, graph theory, color level analysis in its three dimensions, changes in grayscale, particle classification for identifying elements by roundness and size, texture analysis, grayscale and color histogram manipulation, so the resulting algorithm for image processing was an optimized combination of several artificial vision algorithms.

Field tests

Field test were carried out in 10 bovine carcasses processed in a TIF abattoir located in the industrial park of Hermosillo, Sonora, México (29°05'58"N, 110°57'15"W). Tested animals were Brangus bullocks, less than 30 mo old, established by teething. At the end of sacrifice, carcasses were weighted and labeled for identification, and placed in cooling chambers at 0 °C for 24 h. Carcass assessment was performed in a previously conditioned aisle before being taken to the deboning room, which is conventionally used for carcass electronic grading. Aisle conditioning consisted in setting ambient lighting controls, necessary for the color tests.

Carcass evaluation

Cartilage ossification process was checked in the thoracic button located in the twelfth rib. Afterwards, several consecutive pictures of cartilages without the aid of ambient lighting were taken, because the different types of lighting described before were used. Once images were captured, the developed processing algorithms were applied to them, in order to identify cartilage in each image.

Data analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used in the statistical study for analyzing variable normal distribution. Subsequent to a descriptive analysis, Kruskal-Wallis regressions were performed to determine statistical significance at 95 % confidence interval ($P < 0.05$). The SPSS v.11 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)⁽¹⁶⁾ software was used in the statistical analyses.

corte y deshuese Tipo Inspección Federal (TIF), localizada en el Parque Industrial de la ciudad de Hermosillo, Sonora, México (29°05'25.63" N/ 110°57'21.53" O). Los animales fueron de la raza Brangus, machos sin castrar y en edades menores de 30 meses, lo cual se estableció de acuerdo a su dentición. Al final del faenado las canales se pesaron, y se etiquetaron para su identificación y posterior conducción a las cámaras de enfriamiento (0 °C), donde permanecieron por 24 h. La evaluación de las canales se llevó a cabo en un pasillo acondicionado antes de ser introducidas a la sala de deshuese, que convencionalmente también es utilizado para la clasificación electrónica de las canales. El acondicionamiento del pasillo consistió en establecer controles de iluminación ambiental, necesarios para las pruebas de color.

Evaluación de canales

El proceso de osificación del cartílago de las canales fue inspeccionado en el botón torácico localizado en la doceava costilla. Posteriormente, se tomaron varias imágenes consecutivas de los

RESULTS AND DISCUSSION

Bone maturity evaluation by photoluminescence

Bone maturity in a beef carcass can be estimated by means of an image processing system developed for identifying cartilage in a picture, based on both US and Mexican standards. Later, maturity was determined through red color present in specified areas, by means of cartilage area and ossification spots inside it, estimating bone maturity as a percentage between them.

As shown in Tables 1 and 2, there exist discrepancies between both standards in allocating chronological age to a carcass with 11 % ossification in thoracic buttons. In accordance with US standards, this would correspond to an animal 30 to 42 mo old, while following Mexican standards, the carcass would be from an animal 25 to 30 mo old. Therefore, in accordance with Mexican standards, this carcass could be graded as “Selecta”, but in the US, following its standard, it could be graded as “Prime”, “Choice”, “Standard” or “Utility”, but never as “Select”. Beyond quality grade, in both countries, quality

Tabla 1. Madurez ósea y edad cronológica según la norma Mexicana

Table 1. Bone maturity and chronological age in accordance with Mexican standards

	Maturity group				
	I	II	III	IV	V
Ossification percentage in thoracic buttons (12 th rib)	0-10	10-35	35-70	70-90	90-100
Approximate age, mo	18-24	25-30	31-36	37-48	>48

Cuadro 2. Madurez ósea y edad cronológica según la norma Estadounidense

Table 2. Bone maturity and chronological age in accordance with US standards

	Maturity group				
	A	B	C	D	E
Ossification percentage in thoracic buttons (12 th rib)	0-10	10-35	35-70	70-90	90-100
Approximate age, mo	9-30	30-42	42-72	72-96	>96

cartílagos sin emplear iluminación ambiental, puesto que se utilizaron los diferentes tipos de iluminación ya mencionados. Una vez capturadas las imágenes, se aplicaron los diferentes algoritmos de procesamiento desarrollados, para distinguir el cartílago en la imagen.

Análisis de la información

En el análisis estadístico se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para valorar la distribución normal de las variables. Posteriormente al análisis descriptivo, se llevaron a cabo regresiones de Kruskal Wallis para determinar la significancia estadística a un intervalo de confianza del 95% ($P < 0.05$). Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 11 (SPSS Inc. Chicago, USA)⁽¹⁶⁾.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la madurez ósea por fotoluminiscencia

Para estimar la madurez ósea de una canal de bovino se desarrolló un sistema de procesamiento de imágenes que logra identificar el cartílago en una imagen, basado en las normas de México y Estados Unidos. Posteriormente, también se determinó el grado de madurez en base a la presencia de coloración rojiza que se presenta en las regiones detectadas, mediante la evaluación del área del cartílago y de las manchas de osificación en los mismos, calculándose el grado de madurez ósea como un porcentaje que los relaciona.

Como se aprecia en los Cuadros 1 y 2, existen ciertas discrepancias entre ambas normas para asignar, por ejemplo, una edad cronológica a una canal que muestra un 11 % de osificación en botones torácicos. Según la norma estadounidense una canal así correspondería a un animal entre 30 y 42 meses de edad, mientras que en la norma mexicana este animal podría tener entre 25 y 30 meses. Entonces, de acuerdo a la norma mexicana, esta canal correspondería a un grado "Selecta", mientras que en la norma estadounidense podría ser Prime, Choice, Standard, Utility, pero no Select.

in an animal less than 30 mo old is considered better than that given to an older animal. Due to this, the electronic device developed in the present study allows to choose which standard is to be applied.

In the course of sacrifice, when the whole carcass is divided lengthwise in two, changes in cartilage and bone ossification, as well as meat surface texture can be appreciated. These characteristics can be used as indicators of carcass maturity⁽¹⁷⁾. Changes in them can be observed along the spine, especially in the sacral vertebrae, which are the first to ossify and consolidate. Besides, calcification increases with age, which deepens the red color of muscles⁽¹⁸⁾. Assessment of the extent of calcification is dependent on bone softness, porosity and color, and in a young animal the presence of buttons in thoracic vertebrae cartilages, that disappear with age⁽¹⁹⁾.

Applying segmentation techniques in meat and cartilage images

When analyzing the captured images, different tests were performed by means of image processing software, as binary through threshold adjustment, searching for contours, changing color spaces, segmenting by methods like k-means (with different number of layers) and maximum entropy. Later color was analyzed in three dimensions, changing to grayscale; next, particles were classified (at the beginning, photos with round ossification spots were available) so they could be classified in accordance with their shape (roundness) and size. Besides, texture was analyzed by manipulating histograms, in both grayscale and color, testing each color layer one by one or together.

Figure 1 shows two images with different cartilage ossification grades. In the first (a) a carcass with complete ossification can be seen, while in the second (b) a carcass with a certain ossification is shown (inside blue circles). These images were those used in the first tests of the segmentation algorithms, and they will be presented later on.

Más allá del grado de calidad, la calificación de un animal menor de 30 meses es considerada mejor que la dada a un animal mayor de 30 meses en ambas normas. Por ello, en el dispositivo electrónico que se desarrolló en el presente proyecto es posible seleccionar la norma de clasificación del interés del operador.

Durante el sacrificio, al separar las canales en dos partes, se pueden observar los cambios en la calcificación (osificación) de los cartílagos y huesos, así como en la textura superficial de la carne, los cuales son utilizados como indicadores de la madurez de la canal⁽¹⁷⁾. Estos cambios se observan a lo largo de la columna vertebral, especialmente en las vértebras sacras, las cuales son las primeras en osificarse y fusionarse, aumentando la calcificación de éstas al aumentar la edad del animal, lo cual provoca que los músculos sean oscuros⁽¹⁸⁾. La evaluación del grado de calcificación dependerá de la suavidad, coloración y porosidad de los huesos, siendo indicativo de un animal joven cuando aparecen botones en los cartílagos de las vértebras torácicas, las cuales desaparecen con la madurez del animal⁽¹⁹⁾.

Aplicación de las técnicas de segmentación en imágenes en carne y cartílago

En el análisis de las imágenes adquiridas se hicieron pruebas con un software de procesamiento de imágenes, cambiando a forma binaria mediante ajustes en el umbral, buscando contornos, variando el espacio de color, segmentando por métodos como el k-means (con diferentes números de capas) o entropía máxima. Posteriormente, se analizaron los niveles de color en las tres dimensiones, cambiando a escala de grises; después, se hizo la clasificación de partículas (en un principio se tenían fotos con manchas de osificación redondas) para separar con base en la forma (redondez) y el tamaño. Además, se analizó la textura manipulando el histograma, tanto en escala de grises como en color; realizando estas pruebas en cada capa de colores por separado o con mezcla de ellas.

Figura 1. Grado de osificación de canales de bovino de dos diferentes edades fisiológicas: (a) apófisis totalmente osificada, (b) apófisis con grado avanzado de osificación

Figure 1. Ossification amount in bovine carcasses at two different physiological ages, (a) completely ossified apophysis and (b) apophysis showing great ossification progress

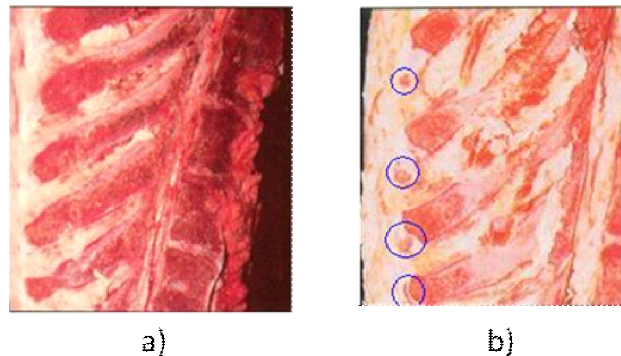
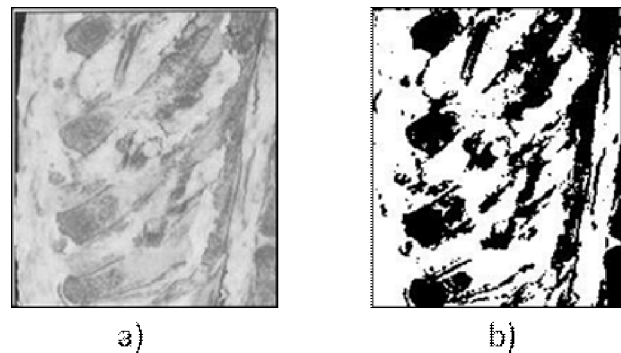


Figura 2. Imágenes del grado de osificación de la canal capturadas bajo diferentes pruebas de umbral de segmentación: (a) escala de grises, (b) imagen binaria

Figure 2. Images of extent of ossification in carcass captured through different threshold segmentation tests, (a) grayscale (b) binary



Segmentation tests by threshold selection

The basic way for converting RGB to grayscales is through the average of the three color layers, estimated through the following equation:

$$I = \frac{\text{Im}(R) + \text{Im}(G) + \text{Im}(B)}{3}$$

La Figura 1 muestra dos imágenes con diferente grado de osificación en los cartílagos. En la primera (a) se observa una canal que presenta osificación completa; mientras que la segunda (b) muestra un caso que presenta osificación con cierto grado de avance, lo cual se indica dentro de los círculos azules. Estas imágenes fueron las que se utilizaron en las pruebas iniciales de los algoritmos de segmentación, las cuales se presentan más adelante de forma detallada.

Pruebas de segmentación por selección de umbral

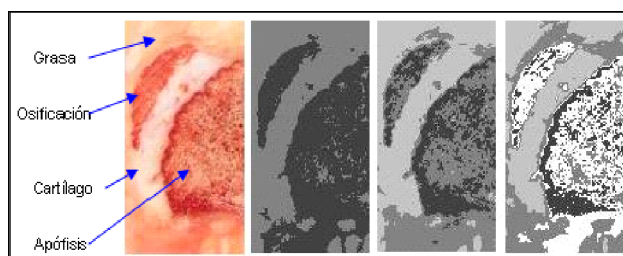
La forma básica de hacer la conversión de RGB a escala de grises es mediante el promedio de las tres capas de color; es decir, promediando las intensidades de cada color mediante la siguiente ecuación:

$$I = \frac{\text{Im}(R) + \text{Im}(G) + \text{Im}(B)}{3}$$

Las imágenes en formato binario, blanco o negro sin escala de grises, pueden obtenerse asignando un valor de 1 ó 255 a los valores por encima de un umbral; 127 por ejemplo, en la escala de grises en la Figura 2(a), y asignando un valor 0 a los valores por debajo del mismo umbral, para

Figura 3. Imágenes de la apófisis con cartilago y osificación que también incluye grasa, procesada mediante k-means en diferentes segmentos: original y k-means con dos, tres y cuatro segmentos

Figure 3. Images of apophysis showing cartilage and ossification including fat, processed through k-means in different segments, original, and k-means with two, three and four segments



Binary images, black and white without grayscale, can be obtained by assigning a value of 1 or 255 to values over a certain threshold; 127, for example, in Figure 2(a) grayscale and assigning a value of 0 to values below that threshold, finally obtaining a binary image as that shown in Figure 2(b). This technique by itself was not enough for identifying cartilage area, as it can be mistaken for fat.

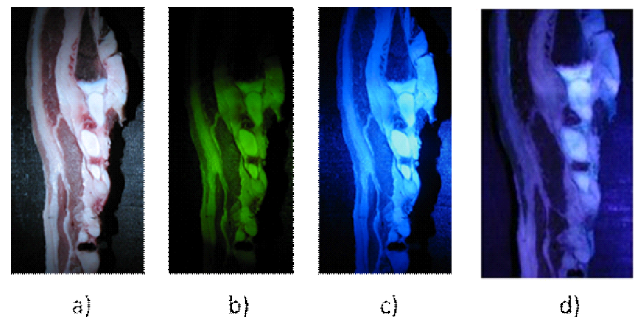
K-means area analysis (clustering)

The type of cartilage images that were analyzed did not show a definite pattern, most probably due to coloring, shape and size, which change between individuals, as well as fat, cartilage and meat color and content. However, three types of tissues are present regularly, fat, bone and skeletal muscle and sometimes, cartilage and ossified cartilage. Owing to this, segmentation tests in similar areas, or color clusters, were performed. This methodology is recommended in those cases where different textures, which can be grouped by class, are present. The method that can accomplish this is called k-means, which receives as entry the image and the number of clusters or elements that need to be identified.

In Figure 3 a picture showing only one apophysis with cartilage and ossification and fat, too, can be

Figura 4. Imagen de una misma canal mostrando áreas con carne, grasa y cartilago iluminados con cuatro tipos de luz diferente: a) luz blanca, b) luz verde a 540 nm, c) luz azul a 440 nm y d) luz ultravioleta a 350-400 nm

Figure 4. Images corresponding to a same carcass showing meat, fat and cartilage areas, illuminated with four different types of light, (a) white, (b) green at 540 nm, (c) blue at 440 nm and ultraviolet at 350-400 nm



finalizar con una imagen binaria como se muestra en la Figura 2(b). Esta técnica por sí sola no fue suficiente para identificar la región del cartílago, pues éste se confunde con la grasa.

Análisis de regiones K-means (clustering)

El tipo de imágenes del cartílago que se trataron de analizar, no presentó un patrón definido, lo cual posiblemente se debió a que la coloración, las formas y tamaños suelen cambiar de un animal a otro, así como la cantidad y color de la grasa, de cartílagos y huesos. Sin embargo, sí presentan (de forma regular) al menos tres tipos de tejidos: grasa, hueso y músculo esquelético, y a veces cartílago y cartílago osificado. Debido a esto se intentaron hacer pruebas de análisis por segmentación en regiones similares, o “clusterizando” por color. Esta metodología es recomendada en aquellos casos donde existe cierta diversidad de texturas, pero que se puedan agrupar en cierto número de clases. El método que logra este tipo de segmentación es el llamado k-means, el cual recibe como entrada la imagen y el número de segmentos clústeres o elementos que se quieren identificar.

En la Figura 3 se muestra la imagen adquirida de una sola apófisis con cartílago y osificación que también incluye grasa y que posteriormente fue procesada mediante k-means en 2, 3 y 4 segmentos. Puede observarse como el método falla en la ubicación del cartílago, ya que una vez más lo confunde con la grasa en los tres casos.

Pruebas de fotografía con diversas fuentes de luz

Dada la diversidad de formas y colores que pueden presentar tanto la grasa como el hueso y el cartílago, las diferentes técnicas de procesamiento de imágenes apuntaron al mismo problema: desarrollar un mejor sistema de captura de imágenes que resaltara con mayor claridad la región del cartílago, sin importar el color o forma de los elementos en la imagen. Para ello se instalaron fuentes de iluminación en varios rangos espectrales como se muestra en la Figura 4.

seen. This image was processed through k-means in 2,3, and 4 segments. The method fails in placing the cartilage, as it is mistaken with fat in the three instances.

Photography tests with three light sources

Due to shape and color diversity in fat, bone and cartilage, the different image processing techniques pointed in the same direction, develop the best image capture system for boosting with greater clarity the cartilage area, not taking into account either color or shape of elements. In order to achieve this, several lighting sources were set up, as shown in Figure 4.

White light (Figure 4a) shows the typical early problem, where fat and cartilage gets mixed up in some areas and not in others. With either blue or green light (Figure 4b and 4c) a slight improvement can be seen, as cartilage seems to reflect light more intensely, but not enough.

Figure 4d shows a clear improvement, as cartilage fluoresces more intensely than adjacent areas. In these lighting source tests, 6 W lamps were used for ultraviolet light (black light with emissions between 350 and 400 nm). Fluorescence turned out by this type of radiation allowed for a significant improvement in cartilage discrimination, so implementation of segmentation techniques for cartilage discrimination for later processing was furthered.

Estimation of the amount of ossification progress

Once it was possible to highlight the desired area, that is to say segmentation of cartilage area, estimation of the amount of ossification progress was put into practice. At this instance, binary image was the entry point, being cartilage white and the other tissues black. The next step requires,

1) Total cartilage area, with and without ossification (B); 2) Ossification areas (R); 3) Estimating ossification percentage using the following formula:

La luz blanca (Figura 4a) muestra el problema típico inicial, donde la grasa y cartílago se confunden en unas regiones y en otras no. Con la luz verde o azul (Figura 4b y 4c) se observa una ligera mejoría, ya que el cartílago parece reflejar la luz con mayor intensidad, pero aún no lo suficiente.

La Figura 4d muestra una clara mejoría, el cartílago fluoresce con mayor intensidad que las regiones adyacentes. Para las pruebas de este tipo de iluminación se utilizaron lámparas de 6W para el caso de luz ultravioleta (luz negra con emisión entre 350 y 400 nm). La fluorescencia generada por este tipo de radiación permitió una notable mejoría en la diferenciación del cartílago, por lo que se prosiguió con la aplicación de técnicas de segmentación para separar la región del cartílago para su posterior procesamiento.

Cálculo de porcentaje de avance de osificación

Una vez que se logró resaltar la región deseada, es decir la segmentación de las regiones ocupadas por los cartílagos, se procedió a determinar el porcentaje de avance de la osificación. En este punto se tuvo como entrada la imagen binaria, que marca con blanco a los cartílagos y en negro el resto de los objetos. El siguiente paso requiere,

- 1) El área total del cartílago con y sin osificación (B);
- 2) el área de osificación (R);
- 3) hacer el cálculo del porcentaje de osificación:

$$%O = \frac{R}{B} * 100$$

Utilizando la escala y correlacionando la madurez ósea del cartílago con la edad cronológica de la canal, mostrada en el Cuadro 1, se logró establecer una relación funcional entre osificación de los botones torácicos y edad aproximada (aplicada a la norma mexicana). Para ello se graficaron los datos de esta tabla y aproximado por mínimos cuadrados a una curva polinomial de tercer grado.

La curva resultante con un R²=0.8289, es:

$$%O = \frac{R}{B} * 100$$

Using the scale and correlating cartilage bone maturity with carcass chronological age, as shown in Table 1, it is possible to establish a functional relationship between thoracic button ossification and approximate age (Mexican standards). For this, data of this table were graphed and approximated through minimum squares to a third degree polynomial curve.

The resulting curve, (for the Mexican standard) being R²=0.829, is the following,

$$Age (months) = 20.298 + 85.365 * O - 200.19 * O^2 + 166.38 * O^3$$

And for the US standard, being R^{*}=0.7411

$$Age (months) = 17.533 + 134.82 * O - 222.93 * O^2 + 197.10 * O^3$$

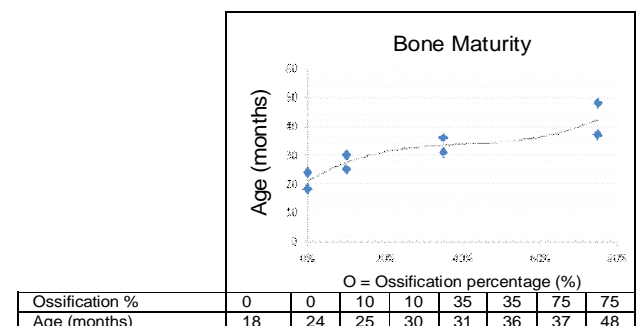
Where O is equal to thoracic button ossification percentage.

Tests with images captured in the TIF slaughterhouse

In order to test that the segmentation system with UV lighting (black light) was the most adequate for this purpose, the image capturing device was set up in a TIF abattoir in Hermosillo, Sonora,

Figura 5. Edad cronológica vs porcentaje de osificación según la norma mexicana

Figure 5. Chronological age vs ossification percentage in accordance with Mexican standards



$$Edad (meses) = 20.298 + 85.365 * O - 200.19 * O^2 + 166.38 * O^3$$

En forma similar para la norma estadounidense, con un $R^2 = 0.7411$:

$$Edad (meses) = 17.533 + 134.82 * O - 222.93 * O^2 + 197.10 * O^3$$

Donde O es el porcentaje de osificación del botón torácico.

Pruebas con imágenes capturadas en rastro TIF

Para probar que el funcionamiento del sistema de segmentación con iluminación UV (luz negra) era el adecuado, el equipo se instaló en una planta TIF para capturar algunas imágenes dentro de las áreas refrigeradas. Las lámparas se montaron en el mismo tripié que la cámara y se construyó una cortina para obstruir la luz ambiental. Las imágenes de la Figura 6, donde (a) corresponde a la fluorescencia de un cartílago, (b) al cartílago segmentado y separado de la imagen original, y (c) a la imagen en binario para identificar el cartílago sin osificación (blanco) y con osificación (rojo) son un ejemplo de este procedimiento.

Aplicando la ecuación, el porcentaje de osificación en este caso fue $O = 3450 / 60,950 = 0.0566 = 5.66 \%$

Utilizando la ecuación para la norma mexicana, se estimó la edad correspondiente:

$$Edad (meses) = 20.928 + 85.368 * 0.566 - 200.19 * 0.566^2 + 166.38 * 0.566^3$$

$$Edad (meses) = 25.1 \text{ meses de edad estimada}$$

En forma similar, según la norma estadounidense:

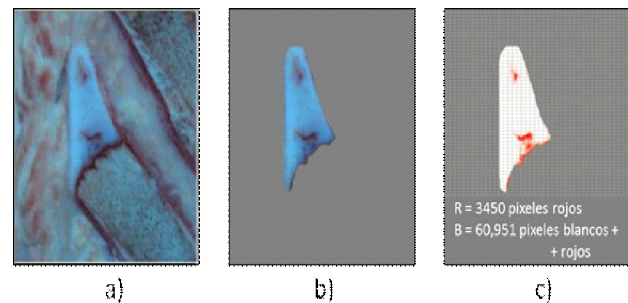
$$Edad_{USA} (meses) = 17.533 + 134.82 * 0.566 - 222.93 * 0.566^2 + 197.1 * 0.566^3$$

$$Edad_{USA} (meses) = 24.5 \text{ meses de edad estimada}$$

Estos resultados confirman que con el uso de las ecuaciones obtenidas, es posible estimar la edad de los animales con una mayor similitud a la edad cronológica, al obtener valores cercanos a los que se obtuvieron con el método que utiliza la evaluación de la dentición.

Figura 6. Ejemplo de aplicación del sistema de segmentación utilizando iluminación UV (luz negra): a) fluorescencia de un cartílago, b) cartílago segmentado y separado de la imagen original y c) imagen en binario para identificar el cartílago sin osificación (blanco) y con osificación (rojo)

Figure 6. Example of use of segmentation system with UV lighting (black light), (a) cartilage fluorescence, (b) segmented cartilage detached from original image, and (c) binary image for identification of cartilage



México. The device was placed in the refrigerated area and lamps were mounted in the same tripod as the camera, and a curtain to keep out ambient light was put in place. Images shown in Figure 6 are an example of this procedure and correspond to (6a) fluorescence of a cartilage, (6b) segmented cartilage and detached from the original image, and (6c) binary image where cartilage without ossification is seen in white and ossified cartilage in red.

Applying the aforementioned equation, ossification percentage in this case was $O\% = 3,450 / 60,950 * 100 = 5.66$

And by means of the equation for the Mexican standard, it was possible to estimate the age of the sacrificed animal

$$Age_{MX} (months) = 20.928 + 85.368 * 0.566 - 200.19 * 0.566^2 + 166.38 * 0.566^3 = 25.1$$

And for the US standard,

$$Age_{US} (months) = 17.533 + 134.82 * 0.566 - 222.93 * 0.566^2 + 197.1 * 0.566^3 = 24.5$$

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Se desarrolló una técnica de análisis de madurez ósea por visión artificial, utilizando una fuente de iluminación en el ultravioleta cercano. Con el dispositivo electrónico construido es posible evaluar en fracción de segundos el porcentaje de osificación del cartílago en el botón torácico de la 12ava costilla de bovinos, y estimar la edad fisiológica del animal según la norma mexicana o la estadounidense. Ambas normas deberán establecer una relación funcional entre el porcentaje de osificación observado y la correspondiente edad cronológica. Con el uso de fuentes ultravioleta por diodos electroluminiscentes con pico en 380 nm, sería posible tener una señal de excitación más definida (pico de emisión más angosto) que las lámparas de luz negra, y por lo tanto la imagen del músculo, grasa y hueso estaría más oscura con relación a la imagen del cartílago. Esto facilitaría aún más la segmentación de la imagen y por tanto la posibilidad de evaluar la madurez ósea de cualquier canal en menos de un segundo. Las ecuaciones obtenidas con este método permiten determinar con mayor precisión la edad de los animales, que con la evaluación de la dentición.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT-COFUPRO por su apoyo financiero para la realización del proyecto Clave 48567 denominado: Dispositivos optoelectrónicos y modelación multivariable para la trazabilidad integral de la calidad en productos cárnicos y administración de ranchos.

LITERATURA CITADA

1. Norma Oficial Mexicana. NMX-FF-078-2002. Productos pecuarios. Carne de bovino en canal. 2002.
2. USDA. United States Department of Agriculture. Official United States standards for grades of carcass beef. Washington: Secretary of Agriculture under the Agricultural Marketing Act of 1946, 1997. 60 Stat. 1087; 7 U.S.C. 1621-1627.

These results confirm that by using the equations developed in the present study, it is possible to estimate age of the sacrificed animals as values obtained through them are very close to those determined by dentition.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

A technique for assessing bone maturity by means of artificial vision using a near ultraviolet light source was developed. With the electronic device built to this effect it is possible to assess in a few seconds ossification percentage of the cartilage in the thoracic button of the 12th rib in bovines and estimating the physiological age of the animal in question, in accordance with both US and Mexican Standards. Both standards should establish a functional relationship between observed ossification percentage and the corresponding chronological age. Use of electroluminescent diode ultraviolet light sources with 380 nm peaks would allow obtaining a more definite excitation signal (due to a narrower emission peak) than with black light lamps, and therefore muscle, fat and bone images should be darker relative to cartilage image. This would facilitate even more image segmentation and for that reason, increase the possibility of assessing bone maturity in any carcass in less than one second. Equations developed in the present study allow ascertaining with greater precision the age of animals than through dentition.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks to Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT-COFUPRO for funding project Clave 48567 "Dispositivos optoelectrónicos y modelación multivariable para la trazabilidad integral de la calidad en productos cárnicos y administración de ranchos" (Optical electronic devices and multivariate modeling for full traceability of quality in meat products and ranch management).

End of english version!

3. Sánchez-Fernández F. Aplicación de la visión artificial en la clasificación y control de calidad de productos alimentarios [tesis doctorado]. Pamplona, España: Universidad Pública de Navarra; 2004.
4. Egelandstal B, Wold JP, Spornich A, Neegard S, Hildrum KI. On attempts to measure the tenderness of Longissimus dorsi muscles using fluorescence emission spectra. *Meat Sci* 2002;60(2):187-202.
5. Seideman SC, Koohmaraie M. Factors associated with tenderness in young beef. *Meat Sci* 1987;20:281-291.
6. Luc C, Clerjon S, Peyrin F, Lepetit J, Culioli J. Sarcomere length determination using front-face fluorescence polarization. *Meat Sci* 2008;80:814-818.
7. Jackman P, Sun DW, Du CJ, Allen P, Downey G. Prediction of beef eating quality from colour, marbling and wavelet texture features. *Meat Sci* 2008;80(4):1273-1281.
8. Díez J, Bahamonde A, Alonso J, López S, del Coz JJ, Quevedo JR, Ranilla J, *et al.* Artificial intelligence techniques point out differences in classification performance between light and standard bovine carcasses. *Meat Sci* 2003;64:249-258.
9. Swatland HJ. Physical measurements of meat quality: optical measurements, pros and cons. *Meat Sci* 1994;36:251-259.
10. Clerjon S, Peyrin F, Lepetit J. Frontal UV-visible fluorescence polarization measurement for bovine meat ageing assessment. *Meat Sci* 2011;88:28-35.
11. Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. On-line classification of US Select beef carcasses for longissimus tenderness using visible and near-infrared reflectance spectroscopy. *Meat Sci* 2005;69:409-415.
12. Swatland HJ, Brooks JC, Miller MF. Possibilities for predicting taste and tenderness of broiled beef steaks using an optical-electromechanical probe. *Meat Sci* 1998;50:1-12.
13. Swatland HJ. Analysis of signals from a UV fluorescence probe for connective tissue in beef carcasses. *Comput Electron Agric* 1991;6:225-234.
14. Swatland HJ. Bidirectional operation of a UV fluorescence probe for beef carcass connective tissues. *Comput Electron Agric* 1992;7:285-300.
15. Swatland HJ. Connective and adipose tissue detection by simultaneous fluorescence and reflectance measurements with an on-line meat probe. *Food Res Int* 2000;33(9):749-757.
16. SPSS. SPSS for windows (version 11). Chicago, USA: SPSS Inc. 1999.
17. NLSMB. Meat evaluation handbook. Chicago, USA: National Live Stock and Meat Board; 1988.
18. Wilson NRP, Dyett EE, Hughes RB, Jones CRV. Meat and meat products: factors affecting quality control. London, UK: Applied Science Publishers. LTD; 1981.
19. Levie A. Meat handbook. 4th ed. USA: AVI Publishing, Co. Inc.; 1981:3-37.