

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ELETRÔNICA E MICROELETRÔNICA

Este exemplar corresponde a redação final da tese
defendida por ANDRÉ MAURÍCIO
TEIXEIRA e aprovada pela Comissão
Julgada em 31 / 08 / 1999

Orientador

**PROPOSTA DE AUTOMATIZAÇÃO DO SISTEMA
DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS EM LEITE**

ANDRÉ MAURICIO TEIXEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. ELNATAN CHAGAS FERREIRA

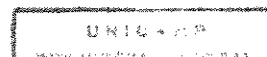
CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. PILAR RODRIGUEZ DE MASSAGUER

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
Elétrica e de Computação da Universidade Estadual
de Campinas, como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Engenharia Elétrica.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Elnatan Chagas Ferreira - FEEC/UNICAMP - Presidente
Prof. Dr. Paulo Estevão Cruvinel - EMBRAPA - São Carlos
Prof. Dr. Oséas Valente de Avilez Filho - FEEC/UNICAMP

Campinas
31/08/1999



9253

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	T235p
V.	Ex.
TOMBO	80/39333
PREÇO	229,99
G	☐ D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/10/99
N.º CPD	

CM-00136613-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

T235p

Teixeira, André Mauricio

Proposta de automatização do sistema de contagem de bactérias em leite. / André Mauricio Teixeira.-- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientadores: Elnatan Chagas Ferreira, Pilar Rodrigues de Massaguer.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Bactérias. 2. Microorganismos - Contagem. 3. Leite. 4. Microbiologia. I. Ferreira, Elnatan Chagas. II. Massaguer, Pilar Rodrigues. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

SUMÁRIO

NOMENCLATURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
CAPITULO 1 – INTRODUÇÃO	10
1.1 – FLORA BACTERIANA PRESENTE NO LEITE CRU	12
1.2 – INFLUÊNCIA DA ARMAZENAGEM E DO TRANSPORTE NA POPULAÇÃO BACTERIANA NO LEITE CRU	16
1.3 – MULTIPLICAÇÃO BACTERIANA EM LEITE ARMAZENADO	17
1.4 – BACTÉRIAS EM LEITE ARMAZENADO	18
1.5 – LEGISLAÇÃO	18
CAPITULO 2 - TÉCNICAS DE CONTAGEM	20
2.1 – DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE <i>CONTAGEM EM PLACAS</i>	20
2.1.1 – PREPARAÇÃO DO (PCA)	21
2.1.2 – DILUIÇÕES E PLAQUEAMENTO	21
2.1.3 – INCUBAÇÃO	23
2.1.4 – CONTAGEM	23
2.1.5 – LIMITAÇÕES DO MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACAS	24
2.2 – DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE CONTAGEM " <i>DEFT</i> "	25
2.2.1 – MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA	28
2.3 – DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE CONTAGEM " <i>BACTOSCAN</i> "	29
2.3.1 – PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO BACTOSCAN	30
2.4 – DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE CONTAGEM " <i>COBRA</i> "	32
CAPITULO 3 – ENSAIOS PRELIMINARES	34
3.1 – MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACAS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU E PASTEURIZADO	34
3.1.1 – ÁGUA DE DILUIÇÃO	35
3.1.2 –PREPARO DO (PCA)	36
3.1.3 – AMOSTRA	36
3.1.4 – CONTAGEM	37
3.2 – MÉTODO DEFT EM AMOSTRAS DE LEITE CRU	38

3.2.1 – MATERIAIS	38
3.2.2 – PREPARO DOS REAGENTES	39
3.2.3 – TRATAMENTO ENZIMÁTICO	40
3.2.4 – TORRE DE FILTRAÇÃO.....	41
3.2.4.1 – FUNCIONAMENTO DA TORRE DE FILTRAÇÃO.....	42
3.2.5 – COLORAÇÃO E MONTAGEM DO FILTRO.....	42
3.2.6 – CONTAGEM.....	43
3.2.7 – UTILIZAÇÃO DO MICROSCÓPIO DE EPIFLUORESCÊNCIA	45
3.2.8 – INOVAÇÃO NO PROCEDIMENTO	46
3.2.9 – IMAGEM DE BACTÉRIAS.....	47
CAPITULO 4 - RESULTADOS COMPARATIVOS	55
4.1 - CONTAGEM EM PLACAS DE LEITE CRU "B"	56
4.2 - CONTAGEM COM O DEFT DE LEITE CRU "B"	57
4.3 - ESTUDO DE DISPERSÃO	59
CAPITULO 5 - PROPOSTA DE AUTOMATIZAÇÃO DO "DEFT"	61
5.1 – INTRODUÇÃO.....	61
5.2 – CARACTERÍSTICA DE CADA UNIDADE	64
5.2.1 – UNIDADE DE CONTROLE CENTRAL MICROPROCESSADA	64
5.2.2 – UNIDADE DE PREPARO E COLETA DAS AMOSTRAS	65
5.2.2.1 – FUNCIONAMENTO DO COLETOR	66
5.2.3 – UNIDADE DE INCUBAÇÃO.....	68
5.2.3.1 – DOSADOR PARA TRATAMENTO ENZIMATICO.....	68
5.2.3.2 - MINI-INCUBADORAS	69
5.2.3.3 - PLATAFORMA DAS MINI-INCUBADORAS	71
5.2.4 - UNIDADE DE FILTRAÇÃO E COLORAÇÃO	73
5.2.4.1 - DOSADOR PARA COLORAÇÃO	73
5.2.4.2 – PLATAFORMA DAS TORRES	74
5.2.5 – UNIDADE DE PREPARO PARA VISUALIZAÇÃO.....	77
5.2.5.1 – MICROSCÓPIO DE EPIFLUORESCÊNCIA	78
5.2.6 - UNIDADE DE CONTAGEM POR TRATAMENTO DE IMAGEM	79
5.2.6.1 - PLACA DE AQUISIÇÃO DE IMAGENS	79
5.2.6.2 - SOFTWARE PARA TRATAMENTO DE IMAGEM	81

5.2.6.3 - SUGESTÃO DE RECONHECIMENTO E CONTAGEM USANDO	
o " <i>IMAQ-VISION</i> "	81
5.3 - LÓGICA DE FUNCIONAMENTO	93
CAPITULO 6 - CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	105
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	108

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Elnatan Chagas Ferreira, pela amizade, entusiasmo e principalmente a confiança com que me orientou.

À Ana Lourdes e Bernadete do laboratório de tecnologia de alimentos.

Ao Prof. Dr. Mauro Leitão pela atenção e a orientação inicial para o direcionamento de meus trabalhos.

À minha co-orientadora Prof. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer que muito contribuiu para minha iniciação na área da microbiologia.

Às colegas Heloísa Batista, Rosa.M. Tosello, Regina Maria e Cidinha pelo apoio técnico nos experimentos de laboratório.

À Ademilde Felix pelas diversas revisões tanto no trabalho como nas publicações.

Ao Elias pelo fornecimento das amostras de leite.

À "CAPES" pelo apoio financeiro.

DEDICATÓRIA

À minha esposa Cleonice companheira de todos os momentos e aos nossos dois filhos Andrezinho e Gustavo por tornarem este trabalho muito mais valioso e significativo.

Ofereço

À minha mãe Maria Aparecida, meu pai e meus irmãos pelo apoio e carinho.

Dedico

NOMENCLATURAS

ACRIDINE ORANGE - Corante Fluorescente

AUTOCLAVAR - Submeter um produto a esterilização a 121⁰C por 15 minutos

DEBRIS - Detritos, partes indesejadas

DEFT - Direct Epifluorescent Filter Technique

DIPOA/MA - Divisão de inspeção de produtos de origem animal do Ministério da Agricultura

EPIFLUORESCÊNCIA - Fluorescência por reflexão

INCUBAÇÃO - Aquecimento ou resfriamento de um produto com temperatura controlada

INOCULAÇÃO - Ato de pipetar a diluição em uma placa de Petri e homogenizá-la com o "PCA"

PLAQUEAMENTO - Escolha das diluições para inocular e em seguida incubar

PIPELINE - Execução de determinado número de tarefas iguais seguidamente

PCA - Agar padrão para contagens

RIISPOA/MA - Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura

UFC / ml - Unidade Formadora de Colônias por mililitro

CPF - Controlador Pneumático de Fluxo

NMVC - Número de Microrganismos Viáveis por Campo

UCCM - Unidade de Controle Central Microprocessada

RESUMO

Os aparatos de laboratórios para análise que são usados para suprir as necessidades do Brasil na avaliação da qualidade do leite, são em sua maioria importados. O Departamento de Microeletrônica da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação e a Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP estão trabalhando com uma proposta de avaliação da contagem microbiológica no leite através de um método de contagem confiável, rápido e de forma automatizada.

Hoje no Brasil utiliza-se o método de contagem em placas como padrão para a contagem microbiológica no leite e, com o tipo mais simples destes testes, leva-se pelo menos 48 horas para se obter os resultados. Este trabalho apresenta um método e uma futura proposta de automatização no mínimo noventa vezes mais rápido que o de contagem em placas chamado *DEFT - Direct Epifluorescent Filter Technique*, o que significa a possibilidade deste tipo de análise passar de análise de controle para análise de seleção. Foi feita uma detalhada descrição de cada método para a comparação em termos de tempo e custo de cada um e também um teste de correlação entre ambos com resultados acima do esperado.

O domínio das técnicas foi imprescindível para criação da proposta do projeto inicial de automação. A fase de domínio da técnica DEFT trouxe uma inovação no procedimento que produziu uma melhora significativa nos resultados finais, além do uso de um sistema de filtração projetado pela equipe de pesquisadores e técnicos envolvidos no projeto. Com este projeto conseguiu-se resultados equivalentes e em alguns casos até melhores do que os de pesquisadores internacionais da área e com custos 75% menores.

É proposto todo o desenvolvimento mecânico de manipulação dos reagentes e seus respectivos acionamentos, que estarão divididos em seis unidades que são: Unidade de preparo e coleta da amostra, Unidade de incubação, Unidade de filtração e coloração, Unidade de preparo para visualização, Unidade de contagem e tratamento de imagem utilizando o *IMAQ-Vision da National Instruments* e uma Unidade de controle central microprocessada que controlará todo o sistema e estarão descritas de forma detalhada.

Palavras-chave: DEFT, Bactérias, Contagem Microbiológica, Leite

ABSTRACT

The laboratory wares which are used for analysis and which supply the needs of Brazil in the evaluation of the quality of milk are, in most of the cases, imported. The Department of Microelectronics at School of Electrical Engineering, together with Faculty of Food Engineering (both at UNICAMP) are working with a proposal for evaluation of microbiological count in milk using a reliable and fast count method in an automated form.

The plate count method is used currently in Brazil as a standard for the microbiological count in milk, and the most simple type of these tests takes at least 48 hours to obtain the results. This work presents a method and a future automation proposal at least ninety times faster than the plate count called DEFT – Direct Epifluorescent Filter Technique, which means that this type of analysis can change from control analysis to selection analysis. It was made a detailed description of each method for the comparison in terms of time and cost and also a correlation test between both of them, and the results obtained were better than the expected.

The domain of the techniques was indispensable the creation of the proposal of the initial project of automation. The phase of domain for the DEFT technique brought not only an innovation for the procedure that produced a significative improvement for the final results but also the use of a filtration system projected by the researchers and technicians involved in the project. With this project, results equivalent to those achieved by foreign researches of the area have been obtained, and in some cases these results were even better and 75% less expensive.

It is proposed the whole mechanical development for the manipulation of the reagents and its respective operations, which are divided into six phases of operation: unit of preparation and collect of the sample, unit of incubation, unit of filtration and coloration, unit of preparation for visualization, unit of count and image treatment using the *IMAQ-Vision of National Instruments* and a unit of microprocessed control that will control the whole system, which is described in a detailed form in this work.

Key-words: DEFT, Microbiological Count, Bacterias, Milk

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Nota-se com o passar do tempo uma grande mudança tanto no referencial de pagamento do leite ao produtor quanto na qualidade do mesmo. Há algum tempo, em quase todo o país, o leite deixou de ser vendido diretamente do produtor ao consumidor, de porta em porta, sem nenhum tipo de tratamento e passou a ter intermediários como as Cooperativas e Fábrica de laticínios responsáveis pela seleção, tratamento de higienização, pasteurização, ou seja, começou a passar por processos que o tornassem próprio para o consumo humano.

O teor de gordura é considerado um dos parâmetros mais importantes para pagamento ao produtor na maioria das regiões brasileiras e, juntamente com a contagem microbiológica, dois dos parâmetros para a classificação dos tipos “A”, “B”, “C” e outros padronizados. O leite integral apresenta o teor de gordura original, ou seja, não deve ser retirada ou adicionada gordura ao leite, e se enquadram nestas determinações os leites tipo “A” e “B”.

O leite padronizado é aquele que apresenta padronizações, no teor de gordura, estabelecidos pela DIPOA/MA - Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura. Esta divisão estabelece um patamar de 3%, ou seja, se o leite chegar ao laticínio ou à cooperativa de leite com menos de 3%, é permitida a adição de gordura, do mesmo modo que é permitido a sua retirada caso o leite tenha mais de 3%, que é o caso do leite tipo “C”. O leite passa a ser classificado como magro com menos de 3% de gordura; porém, não se permite que o teor de gordura fique abaixo de 2%. O leite desnatado é aquele no qual se retira a totalidade da gordura [1].

Por outro lado, existem outros parâmetros que devem ser verificados em uma plataforma de recepção de leite como: acidez, crioscopia e densidade. As cooperativas ou fábricas

de laticínios controlam estes parâmetros de forma individual, ou seja, as análises citadas são feitas para cada produtor, por meio de amostras individuais, mas existem ainda as cooperativas que fazem algumas dessas análises por amostragem.

Apesar desses controles, a qualidade do leite brasileiro, se comparada à de alguns países da Europa, é muito baixa, principalmente no que diz respeito à contaminação bacteriológica. Isto acontece porque o sistema de ordenha, manipulação, armazenamento e transporte do leite é precário, com ordenhas sem critérios e acondicionamento feito em tambores (adiabáticos em tese), colocados a beira da estrada, sujeitos a intempéries como forte calor e poeira, à espera do caminhão coletor. Felizmente, os governantes estão se empenhando para melhorar o padrão, mudando e melhorando a Legislação que controla a qualidade e os níveis de higiene, inclusive com uma proposta que sugere o fim do leite "C". Serão adotados no trabalho dois termos com o mesmo significado: *Número de microrganismos* e *Número de bactérias* isto porque, na literatura consultada estes termos foram frequentemente utilizados.

A contagem do número de microrganismos do leite é o que existe de mais atual em termos de obtenção de qualidade. Nos países mais desenvolvidos, principalmente na Europa, mais de 90% deles utilizam este recurso de forma automatizada para pagar os produtores de leite.

Aqui no Brasil, empresas como Batavo, Nestlé, Fleischmann Royal, Parmalat, Paulista, que utilizam grandes volumes de leite diariamente para consumo e fabricação de produtos derivados, constantemente se deparam com o problema da demora para obtenção de resultados de contagem microbiológica através de plaqueamento. Deste modo a fiscalização do leite para consumo humano no Brasil é averiguada basicamente através de análises físico-químicas e as microbiológicas, dois dias depois. Este trabalho foi direcionado unicamente à parte microbiológica, por se entender que há falta de tecnologia de ponta nessa área no Brasil e também de técnicos especializados em contagens rápidas, no campo da microbiologia para leite.

Deste modo os objetivos deste trabalho foram:

- Domínio das técnicas DEFT - Direct Epifluorescent Filter Technique e da Contagem em placas.
- Validação do procedimento por meio de comparação entre os métodos de Contagem em placas e o DEFT.
- Identificação de algumas bactérias através da aquisição e do tratamento de imagens, já que não existe nenhum aparelho de contagem de bactérias em leite totalmente automatizado que exerça essa função.
- Proposta de automatização do processo DEFT.

1.1 - FLORA BACTERIANA PRESENTE NO LEITE CRU

Historicamente uma das primeiras tentativas de investigação bacteriológica foi realizada por Sedgewick & Batchelder, em 1892 na cidade de Boston. No entanto, dados que constam do ano de 1880 sobre a metodologia para a enumeração e contagem de bactérias em placas com um meio de cultura sólida, já tinham sido descritos por Robert Kock [2]. Sete anos depois, esta metodologia de plaqueamento foi aperfeiçoada por Petri, advindo dessa data o nome dado às placas destinadas à contagem, na metodologia utilizada até os dias atuais.

O aparecimento de doenças no homem e a deterioração do leite e seus derivados levaram os pesquisadores a desenvolver um modo para verificação da qualidade microbiológica do leite considerando sua flora existente. Em 1857 Louis Pasteur verificou que ocorria uma fermentação ácida no leite devido à ação de determinados germes denominados de *Bacterium lactis*, atualmente conhecidos *Streptococcus lactis*, que foram isolados e descritos por

Joseph Lister em 1873. A palavra *Streptococcus* determina um gênero de bactérias homofermentativas anaeróbias facultativas e a palavra *lactis* determina espécie, de um dos quatro grupos em que está dividido o gênero *Streptococcus* na flora leiteira [2] que são:

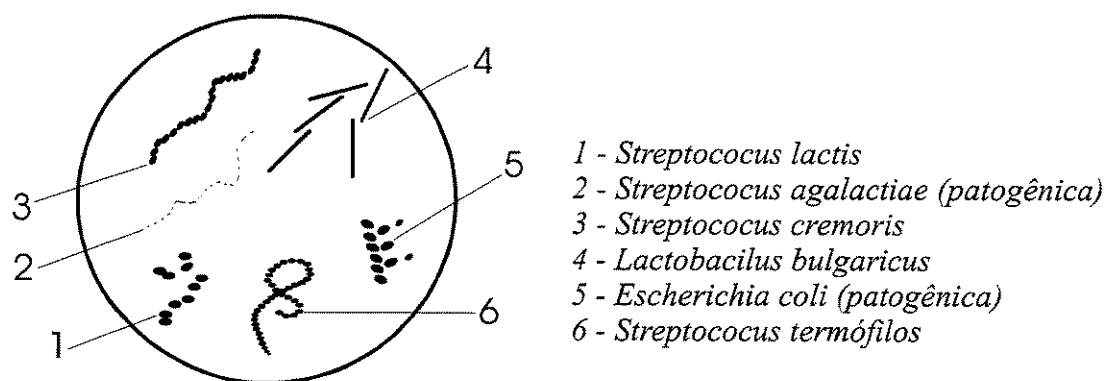


Figura 1 – Morfologia de algumas bactérias de leite

- a) Grupo Pyogens: bactérias patogênicas e em sua maioria hemofílicas. Está incluído neste grupo o *Streptococcus agalactiae*, responsável pela produção de um determinado tipo de mamite contagiosa.
- b) Grupo Viridans: são bactérias não hemofílicas e entre elas encontra-se o *Streptococcus termófilos*, que não é patogênica e é responsável pela maturação e acidificação de queijos e também faz parte da flora bacteriana do iogurte.
- c) Grupo do Esterococcus: de origem intestinal, resistentes à temperatura e halófilos (suportam até 6,5% de sal) tendo como temperatura ótima para o crescimento a faixa de 10 a 45°C.
- d) Grupo Láctico: sem dúvida os mais comuns. São eles os *Streptococcus lactis* e o *Streptococcus cremoris* responsáveis pela coagulação espontânea. O *Streptococcus lactis* produz uma substância com efeitos antibióticos denominada de nisina, que é um produto termoestável inibidor do desenvolvimento de um grande número de bactérias gram-positivas [3].

Sob o ponto de vista morfológico, a flora bacteriana do leite se apresenta de uma forma relativamente simples, como pode ser verificado nas Figuras 1 e 2, nas quais estão presentes algumas formas e agrupamentos de bactérias em leite. Por isso, acredita-se na possibilidade de identificação de alguns microrganismos por meio de tratamento de imagem e de sua morfologia que, como anteriormente citado, trata-se de um ponto falho nos sistemas automáticos para contagem existentes atualmente.

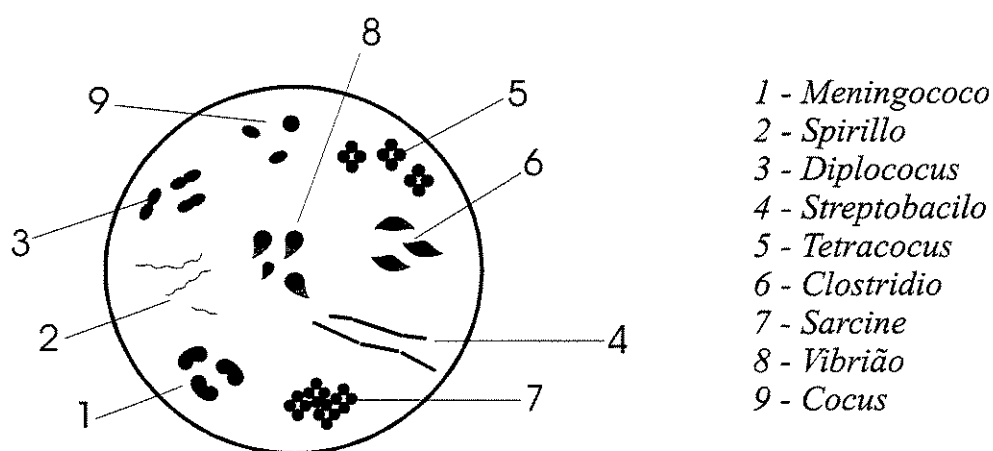


Figura 2 – Morfologia e agrupamentos bacterianos comuns de leite cru

A Tabela 1 demonstra os microrganismos possíveis de se encontrar na flora bacteriana do leite cru como os psicotrófilos, que têm como temperatura ótima de crescimento o intervalo de 5 a 7°C, os aeróbios mesófilos que crescem a aproximadamente 32°C e os termófilos, que sobrevivem a temperaturas de 63°C por até 30 minutos.

Tabela 1 - Tipos de microrganismos encontrados no leite cru

PSICROTÓFILOS	MESÓFILOS					TERMÓFILOS
	Micrococci	Streptococci	Asporogenous Bastonetes Gram-positivos	Formadores de esporos	Bastonetes Gram-negativos	Outros
<i>Pseudomonas</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Enterococcus</i> (fecal)	<i>Microbacterium</i>	<i>Bacillus</i> (Células vegetativas ou esporos)	<i>Pseudomonas</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Staphylococcus</i>		<i>Corynebacterium</i>		<i>Acinetobacter</i>	<i>Leveduras</i>
<i>Flavobacterium</i>		Grupo N	<i>Arthrobacter</i>		<i>Flavobacterium</i>	<i>Fungos</i>
<i>Aerobacter</i>		<i>Mastitis Streptococci</i>	<i>Kurtzia</i>		<i>Enterobacter</i>	Esporos de bacillus
<i>Alcaligenes</i>		<i>Strep. agalactiae</i>			<i>Klebsiella</i>	Esporos de <i>Clostridium</i>
<i>Bacillus</i>		<i>Strep. dysgalactiae</i>			<i>Aerobacter</i>	<i>Alcaligenes</i>
<i>Arthrobacter</i>		<i>Strep. uberis</i>			<i>Escherichia</i>	
					<i>Serratia</i>	
					<i>Alcaligenes</i>	

Um leite cru de boa qualidade [5], ou seja, com baixa contagem bacteriana pode normalmente apresentar uma incidência de microrganismos como aqueles apresentados na Tabela 2, na qual a incidência (%) é a provável quantidade relativa de microrganismos que normalmente serão encontrados em uma amostra de leite cru.

Tabela 2 - Microrganismos de um leite de boa qualidade [5].

Grupo	Incidência (%)
Micrococci	30 - 99
Streptococci	0 - 50
Asporogenous bastonetes gram-positivos	< 10
Bastonetes gram-negativos (coliformes)	< 10
Esporos de Bacillus	< 10
Outros (incluindo streptomycetes)	< 10

1.2 - INFLUÊNCIA DA ARMAZENAGEM E DO TRANSPORTE NA

POPULAÇÃO BACTERIANA DO LEITE CRU

Depois da ordenha o leite é colocado em latões ou em tanques de expansão, e geralmente refrigerado, onde fica a espera da coleta feita em dois tipos de caminhões: caminhões isotérmicos ou caminhões comuns com carroceria e proteção de lona. A tendência é o fim dos caminhões com carroceria por serem pouco apropriados em termos de acondicionamento e de higiene para este tipo de trabalho, trazendo para o leite um maior risco de contaminação. Em países de clima tropical como o Brasil, onde a maioria do leite é acondicionado em latões e a refrigeração é precária, o clima acaba propiciando uma temperatura ótima para a multiplicação

bacteriana. A solução para este caso é a ordenha feita duas vezes ao dia para evitar a multiplicação bacteriana e a deterioração do leite.

1.3 - MULTIPLICAÇÃO BACTERIANA EM LEITE ARMAZENADO

A temperatura, o tempo de armazenagem e o número inicial de espécies de microrganismos presentes no leite cru são os fatores que determinam o ritmo de crescimento bacteriano em locais de armazenagem. A Figura 3 mostra o efeito da temperatura e do tempo de armazenagem em um leite com 50.000 UFCs/ml, que pode ser considerado um leite de boa qualidade para o Brasil. [5]

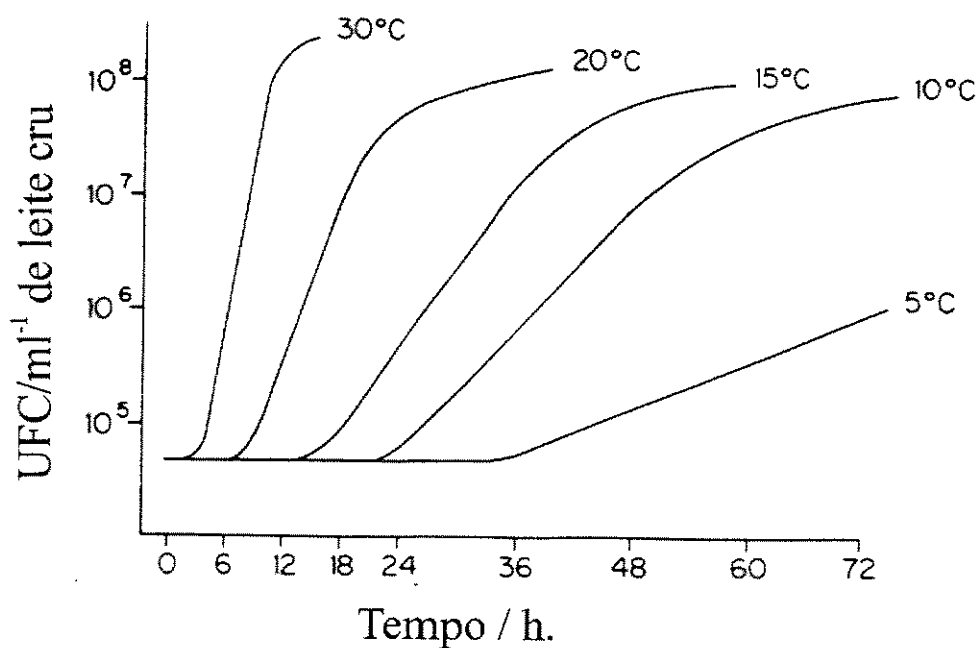


Figura 3 - Efeito da temperatura e tempo de armazenagem no aumento de bactérias no leite cru

1.4 - *BACTÉRIAS EM LEITE ARMAZENADO*

Em 2 ou 3 dias de armazenagem, sob refrigeração correta, a microflora predominante no leite é do gênero *psicrotrófilos*. Os esporos de *bacillus* e *pseudomonas* (Tabela 1) são os mais freqüentes microrganismos presentes e também facilmente eliminados por meio da pasteurização.

A pasteurização, no entanto, não pode eliminar o metabolismo que estes microrganismos podem causar no leite armazenado. Só o cuidado com o material de ordenha pode prevenir uma proliferação deste tipo de bactéria [5].

1.5 - *LEGISLAÇÃO*

Na Legislação Brasileira, tanto o Ministério da Agricultura como o Ministério da Saúde admitem como padrão para contagem do número de microrganismos no leite a contagem em placas, que é um processo que leva no mínimo 48 horas para se obter resultados, e por isso não utilizado como parâmetro de pagamento pelas cooperativas e laticínios, ou seja, empresas de beneficiamento de leite, como acontece em outros países.

O controle de qualidade no leite se inicia no processo de ordenha e se estende até o ambiente de processamento do leite, englobando itens como ventilação, filtragem do ar e testes de contagem de partículas no ar.

A definição de (UFC), que é a unidade que quantifica os microrganismos em leite, será descrita em 2.1.4 de forma detalhada. No Brasil o “RIISPOA / MA - Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura”, estabelece os

seguintes limites para a contagem de microrganismos do tipo mesófilos em leite em unidades formadoras de colônias por ml. (*UFCs / ml*):

Leite “A” - Contagem até 10.000 UFC/ml antes da pasteurização
500 UFC/ml após o processamento industrial
até 2.000 UFC/ml no mercado.

Leite “B” - Contagem até 500.000 UFC/ml antes da pasteurização
40.000 UFC/ml após o processamento
até 80.000 UFC/ml no mercado.

Leite “C” - não existe limites estipulados desses microrganismos antes da pasteurização porém é permitido até 100.000 UFC/ml após o processamento enquanto que no mercado não poderá ultrapassar 300.000 UFC/ml [1]. Para que se faça uma comparação em termos de controle vejamos como é o mesmo tipo de fiscalização em outros países:

CHILE

Leite "A" - 250.000 UFC/ml antes da pasteurização;

Leite "B" - de 250.000 a 500.000 UFC/ml antes da pasteurização;

Leite "C" acima de 500.000 UFC/ml.

URUGUAI

Todo o leite que esteja entre 200.000 e 800.000 UFC/ml.

ARGENTINA

Todo o leite até 500.000 UFC/ml.

UNIÃO EUROPÉIA

Todo o leite até 100.000 UFC/ml.

CAPÍTULO 2 - TÉCNICAS DE CONTAGEM

2.1 - DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE "CONTAGEM EM PLACAS"

O padrão de contagem em placas é ainda hoje um dos métodos de contagem mais conhecidos em nível mundial e é descrito por diversos órgãos de saúde em vários países. O objetivo deste tipo de contagem é avaliar, por meio de um acondicionamento da amostra de leite cru em um ambiente ótimo para o crescimento, a quantidade de microrganismos/ml ou as *UFCs* – *Unidade Formadora de Colônias*. Para isso existe um meio de cultura específico para cada um dos três grupos da Tabela 1.

Pode-se observar na tabela 1 que a maioria dos microrganismos da flora bacteriana no leite cru encontram-se entre os *mesófilos* e é exatamente por esse motivo que, quando se faz uma contagem microbiológica em uma beneficiadora de leite, opta-se por um único meio de cultura, no caso para os aeróbios mesófilos, que é o que cobre grande parte da flora bacteriana da amostra de leite cru.

Esta técnica se resume em quatro etapas básicas:

- Preparo do *PCA* – *Plate Count Agar*, meio de cultura;
- Diluições e plaqueamento;
- Incubação;
- Contagem.

2.1.1 - PREPARO DO (PCA)

Utiliza-se um meio de cultura chamado “PCA - Agar para contagem padrão” para a contagem total de aeróbios mesófilos, (Tabela 1). Cada fabricante traz geralmente na embalagem o modo de preparo que nada mais é do que uma diluição com água destilada deionizada, na proporção indicada pelo fabricante. Depois de diluído este PCA é acondicionado em frascos para ser autoclavado, podendo ser armazenado em geladeira por até 30 dias. Antes do uso, o mesmo deve ser previamente fundido e resfriado a 45⁰C, temperatura esta que deverá ser mantida até o uso [13].

2.1.2 - DILUIÇÕES E PLAQUEAMENTO

As diluições são feitas de forma decimal como mostra a Figura 4;

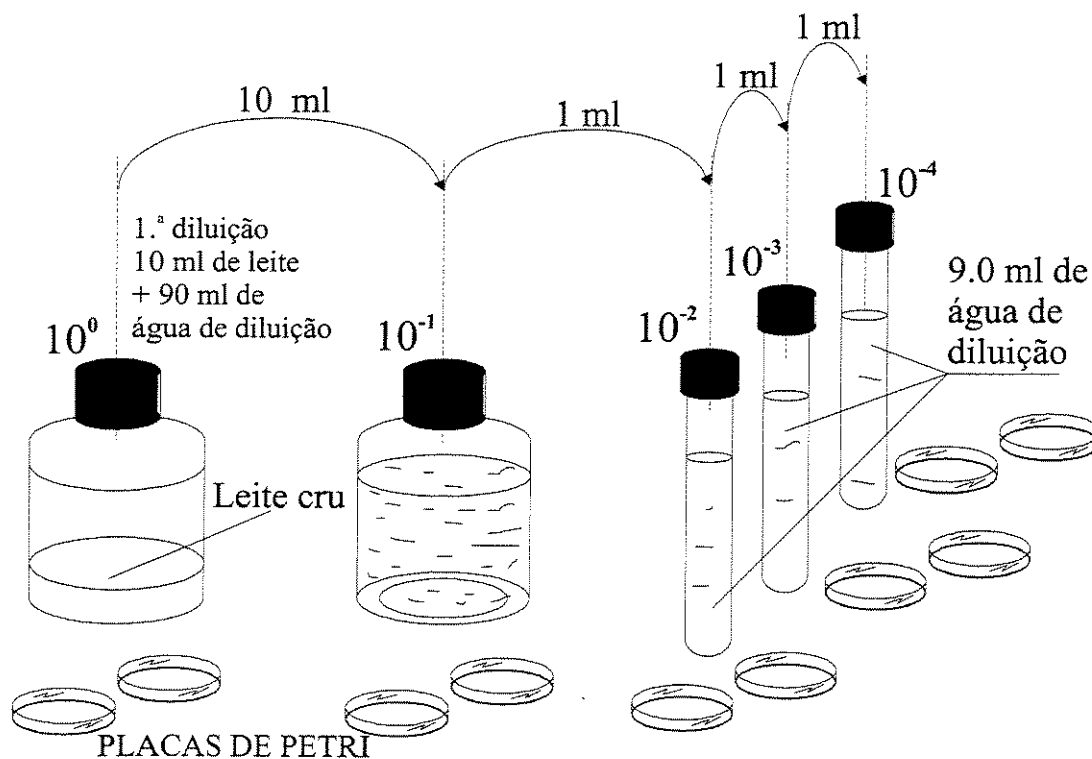


Figura 4 – Procedimento de Diluição

Depois das diluições seriadas o próximo procedimento é o plaqueamento que se inicia pela *inoculação*, que é o ato de selecionar três ou quatro diluições feitas e pipetar 1ml de cada diluição em placas de petri separadas, estéreis e vazias. Para obter bons resultados recomenda-se os seguintes cuidados:

- Depositar 1 ml da diluição fora do centro da placa, pois isso facilitará a posterior mistura com o meio de cultura.
- Selecionar as diluições em função do nível da contaminação estimado da amostra de forma a obter placas com 25 a 250 colônias. Caso o nível da amostra encontre-se na faixa de 2500 a 25000 UFC/ml, as diluições recomendadas são de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Se a contaminação esperada estiver acima dessa faixa, deve-se inocular as diluições mais altas. Caso não seja possível estimar previamente o nível de contaminação recomenda-se inocular mais diluições partindo da inicial.
- Embora não seja imprescindível para aumentar a precisão das contagens recomenda-se inocular duas ou mais placas de cada diluição e não utilizar pipetas com capacidade maior do que 2.0 ml.

Estando as placas devidamente inoculadas, deve-se verter por sobre o inóculo aproximadamente 15 ml de PCA, previamente fundido e resfriado a 45°C . O passo seguinte é misturar o inóculo com o meio de cultura movimentando suavemente as placas, em uma superfície plana, em movimentos em forma de *oito* circulares 8 a 10 vezes no sentido horário e 8 a 10 vezes no sentido anti-horário, movimento este que deverá ser mantido durante toda a prática do procedimento [7].

2.1.3 – INCUBAÇÃO

A incubação deve ser feita depois da completa solidificação do meio de cultura no interior das placas de petri. As placas deverão ser tampadas, viradas com a abertura para baixo e incubadas a 32°C por 48 horas.

2.1.4 - CONTAGEM

Após 48 horas de incubação procede-se a contagem dos microorganismos com o auxílio de um contador de colônias como demonstra na Fig. 5. A Figura 5-A apresenta a tela graduada de um contador de bactérias e a 5-B um contador já com a placa de Petri instalada e pronta para a contagem.

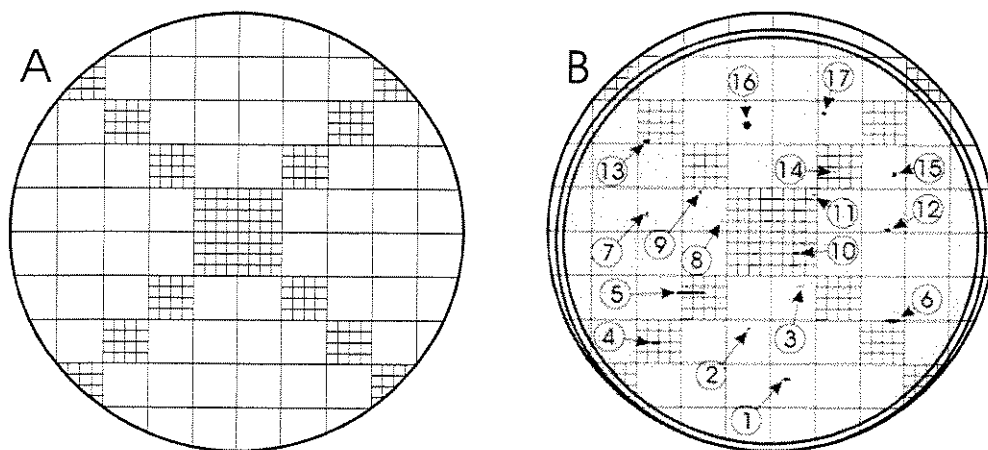


Figura 5 - Contador de Colônias

O resultado é uma estimativa do número de microorganismos presentes nas amostras, isto porque cada pequeno ponto contado na placa representa uma colônia, ou seja, uma célula viável apta a formar naquele local uma colônia de bactérias. O resultado é então expresso em "UFC" - *Unidade Formadora de Colônias*. No caso da Fig. 5B pode-se observar 17 UFCs.

Para o resultado definitivo, deve-se considerar apenas as contagens nas quais o número de *UFCs/ml*. nas placas estiver entre 25 e 250, conforme determinado pela legislação.

2.1.5 - LIMITAÇÕES DO MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACAS

Esse método tem sido um dos mais eficientes e acessíveis aos beneficiadores de leite de países pouco desenvolvidos nessa área, como é o caso do Brasil, porém se forem observados os pontos que devem ser otimizados para uma melhor performance da avaliação microbiológica de leite, provavelmente chegaremos à conclusão de que a contagem em placas é um método totalmente inviável para futuras pretensões na avaliação da qualidade no leite de modo rápido e eficiente. Portanto, a contagem do número de microrganismos poderia tornar-se também um parâmetro para o pagamento a produtores no Brasil, como já acontece em países mais evoluídos na área, caso fossem sanados os seguintes problemas:

- TEMPO DE ANÁLISE: O método de contagem em placas precisa de um período de 2 dias, para a obtenção de resultados no caso dos termófilos e dos mesófilos, e de 7 a 10 dias no caso dos psicrotófilos (Tabela 1).
- CUSTO: Cada análise custa em média R\$ 45,00 (Quarenta e cinco reais).
- POSSIBILIDADE DE IDENTIFICAÇÃO DA BACTÉRIA: Nas contagens em placas é absolutamente impossível a identificação imediata de qualquer tipo microrganismo pois o que ocorre na contagem em placas é a colocação da amostra em um ambiente ótimo para a multiplicação bacteriana, para só então conseguir fazer a contagem das UFCs - Unidade formadora de colônias. Para a identificação é necessário lançar mão de outras técnicas como série bioquímica ou até mesmo *kits*.

- CONTAGEM UNITÁRIA: É um procedimento impossível na contagem em placas, pois as colônias de bactérias observadas através do contador são agrupamentos de células viáveis, que são as chamadas UFCs. Não existe um meio de cultura capaz de nutrir todo o tipo de bactéria, para que as mesmas cresçam e sejam visualizadas em uma só contagem em placas.

Para melhorar estes quatro itens citados, é necessário mudar completamente a metodologia de análise microbiológica direcionada ao leite e adotada por nossa legislação. Existem propostas em outros países para a utilização de equipamentos mais apropriados e sofisticados para a contagem de bactérias: um de origem dinamarquesa produzido pela *Foss-Eletric* e batizado com o nome de BACTOSCAN e outro de origem francesa produzido pela *Biocom* conhecido com o nome de COBRA.

2.2 - DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE CONTAGEM "DEFT"

O início da utilização de membranas para o isolamento de bactérias em leite data do ano de 1957, com o cientista FIFIELD, utilizando um agente surfactante (Triton X-100) com o objetivo de melhorar a filtração das amostras de leite

Esta metodologia adaptada e escrita pelo cientista Gram L. Pettipher (1981) é conhecida como *DEFT - Direct Epifluorescent Filter Technique* para a contagem de bactérias no leite cru por meio de filtragem. Este trabalho causou uma revolução no procedimento de contagem de bactérias no leite pois trata-se de uma técnica muito mais rápida para a obtenção de resultados, "25 minutos", baixo custo em torno de US\$ 1.50 dólares por análise com um bom alcance de contagem 5×10^3 a 5×10^8 [8].

A amostra é submetida a um tratamento enzimático no qual são atacados glóbulos de gordura, células somáticas, caseínas e outras partes da composição do leite que

possam impedir a visualização de bactérias que ficam retidas sobre uma membrana de filtração com poros de $0.6\mu m$ em policarbonato.

Em seguida submete-se a amostra a uma torre de filtração (Fig. 12), previamente preparada e montada com o filtro de membrana de policarbonato. Porém, deve-se aquecer esta torre de filtração antes, colocando 5 ml de Triton X-100 (0.1%), previamente aquecido a $50^{\circ}C$ em banho-maria sobre o filtro, acionando-se em seguida a bomba de vácuo de 100 kPa. Com a bomba de vácuo ainda ligada coloca-se a amostra incubada, aguarda-se a passagem pelo filtro e em seguida mais 5 ml de Triton X-100 (0.1%) aquecido a $50^{\circ}C$. A bomba de vácuo deverá ser desligada assim que todo o reagente no interior da torre tiver passado pelo filtro. As bactérias retidas no filtro são submetidas a um corante fluorescente "acridine orange"

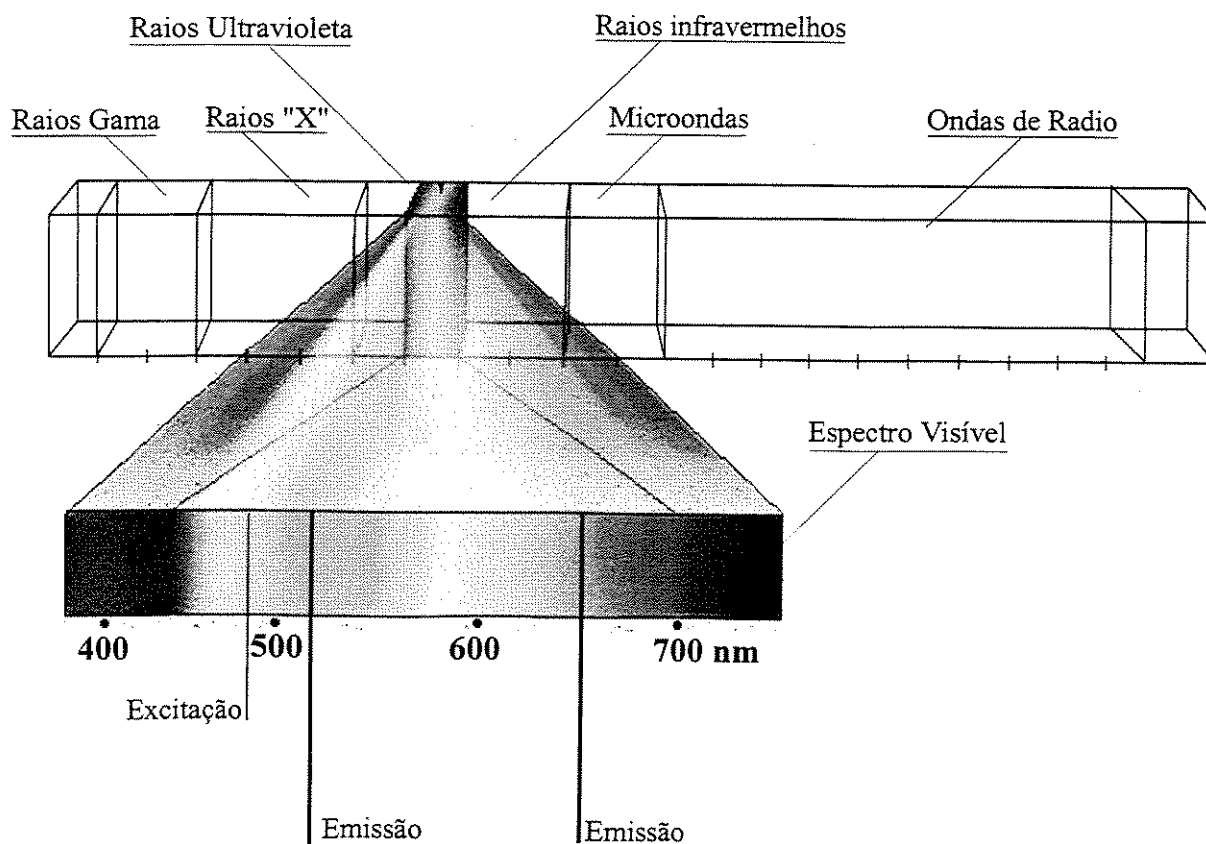


Figura 6 – Atuação do *acridine orange* no espectro visível

para que se faça a distinção entre as bactérias vivas e as bactérias mortas, que se comportam de modo diferente mediante a aplicação do corante, sendo que as bactérias vivas ou viáveis fluorescem na faixa de 650nm (laranja avermelhado) e as bactérias mortas fluorescem na faixa de 520nm (verde) na região visível do espectro de radiação eletromagnética.

Após o término do processo de filtração a membrana é montada em uma lâmina para a visualização e contagem por meio de um microscópio de epifluorescência [8] descrito adiante.

Em 1985, a cientista Ubaldina M. Rodrigues, que foi auxiliar técnica de Pettipher, apresentou um trabalho que trazia melhoramentos na qualidade do material utilizado juntamente com o uso de ultra-som que pode dar uma significativa melhora na filtração e quebra dos agrupamentos bacterianos facilitando, assim, o procedimento de contagem. Este trabalho também trouxe algumas modificações no DEFT como alterações nos volumes da enzima e do detergente no tratamento da amostra, para o aumento da sensibilidade e rapidez [4].

Em 1987 a cientista também publicou um trabalho com 59 culturas de bactérias utilizando os procedimentos propostos em sua publicação de 1985 com bons resultados, tanto nas correlações entre o DEFT e contagem em placas, como nas imagens microscópicas obtidas [6].

2.2.1 - MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA:

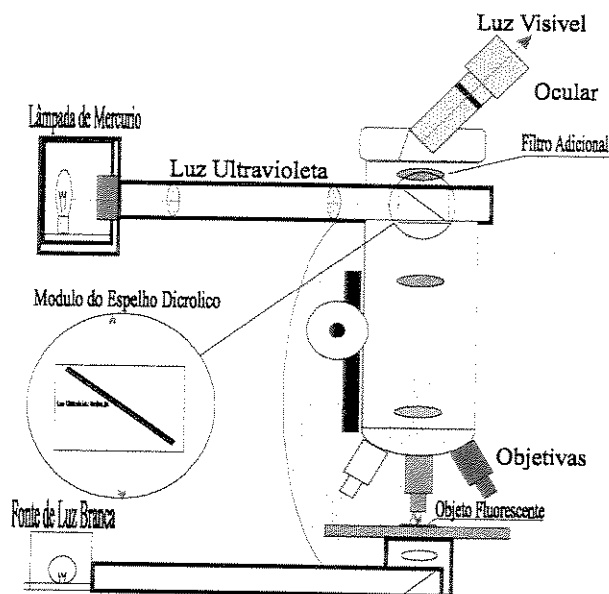


Figura 7 - Princípio da Epifluorescência

Menos conhecida que a microscopia de fluorescência, a microscopia de epifluorescência diferencia-se basicamente no trajeto da luz. Na fluorescência a luz atravessa o objeto fluorescente de baixo para cima, ao passo que na epifluorescência a luz executa uma trajetória inversa a da fluorescência, ou seja, de cima para baixo, e é refletida pelo módulo de espelho dicroico para o objeto fluorescente (Fig. 7). Esta luz não atravessa o objeto fluorescente como na fluorescência e, dessa maneira, a luz que chega ao objeto fluorescente é refletida e mandada de volta ao módulo de espelho dicroico, que além de refletir a luz para o objeto fluorescente, atua como filtro para a luz residual excitada, vinda do objeto fluorescente e deixando passar somente o comprimento de onda a que o módulo está dimensionado [10].

Na prática, é utilizado ainda um *filtro adicional* para evitar qualquer resíduo de luz fora do comprimento de onda desejado, que possa ultrapassar e chegar até a ocular do microscópio.

2.3 - DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE CONTAGEM COM "BACTOSCAN"

Os dados referentes a esta máquina foram obtidos por meio de visitas técnicas ao representante *Foss Eletric* no Brasil e às instalações da Nestlé (Unidade de Ibiá) no estado de Minas Gerais, onde está instalada uma unidade do *Bactoscan*.

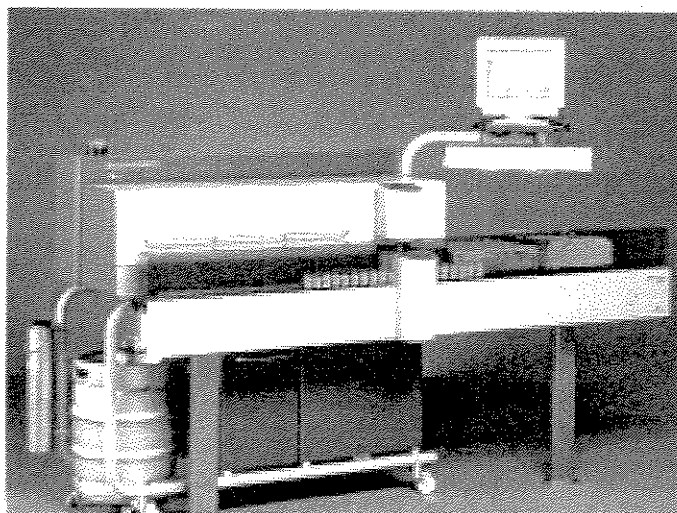


Figura 8 - BACTOSCAN / Foss-Eletric

2.3.1 - PRINCÍPIO FUNCIONAMENTO DO BACTOSCAN

Este aparelho faz a contagem total de bactérias e também de forma individual (Fig. 9). A amostra (1) pré aquecida a 40°C é misturada a um liquido de lisina (2), para quebra das partes indesejadas do leite como: glóbulos de gordura, proteínas, caseínas, células somáticas, etc. Após passagem pela câmara de mistura (3), estas partes do leite são separadas das bactérias por meio de uma centrífuga de alta velocidade (4), que as leva para o gradiente de alta densidade (5), e passam a ser eliminadas por gravidade ou seja, elas literalmente escorregam pelas paredes internas da centrífuga para o esgoto ou local destinado a resíduos. Os microrganismos retidos na centrífuga se encaminham para a câmara de filtração (6), que se encarrega de colocá-los em um dos compartimentos da mini-incubadora (7).

Em seguida é adicionado sobre as bactérias no interior desses compartimentos, um corante que faz com que elas fluoresçam. A luz emitida por elas é detectada por um microscópio de epifluorescência, quando a amostra é depositada em finas camadas sobre um disco giratório (10) por meio de uma micro-seringa (9).

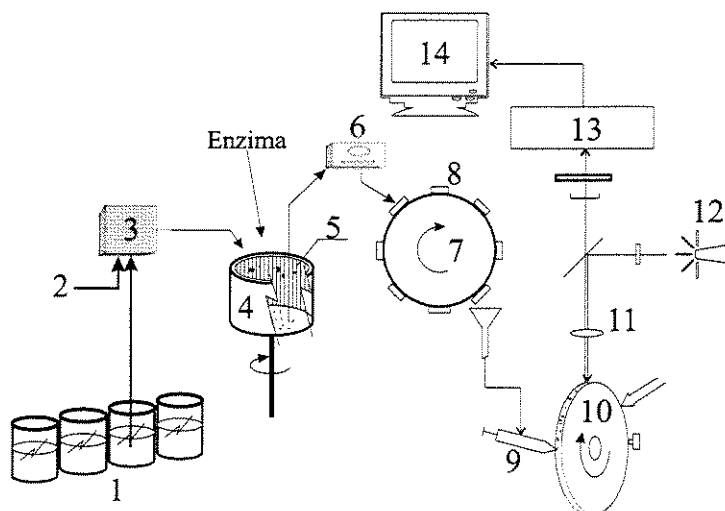


Figura 9 - Esquema de funcionamento do Bactoscan

Com este disco (10) em movimento no sentido indicado pela Fig. 8, as bactérias passam pelo campo de visão da objetiva (11) e, quando são atingidas pela luz emitida pela lâmpada de xenônio (12), que equipa o microscópio de epifluorescência, os pontos de luz emitidos pelos microrganismos são convertidos em pulsos elétricos (13), contados e mostrados em um display digital (14). O tempo de análise do aparelho é em média de 5 minutos e faz leituras de leite fresco de vaca, ovelha, cabra e búfalo. Além disso, sua sensibilidade de alcance de medição está entre 25.000 e 18.000.000 *IBC* - *Individual Bacteria Count*/ml; isto significa aproximadamente 8.000 e 5.000.000 UFCs/ml. O custo por análise desta máquina é de R\$2,50 a R\$3,00 em 03/97. Este aparelho, de origem dinamarquesa, tem um custo de US\$ 200.000 dólares, fora os custos de instalação. A Fig. 10 mostra um teste de correlação entre Bactoscan e a Contagem em placas, com um $r = 0,88$, considerado por especialistas uma boa correlação [11].

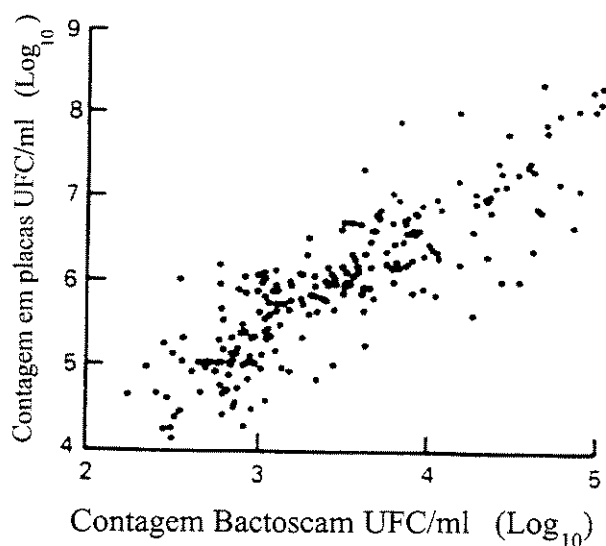


Figura 10 - Correlação entre o Bactoscan e Contagem em Placas

2.4 - DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE CONTAGEM COM "COBRA"

O COBRA é uma máquina pouco conhecida em nível mundial de origem francesa que executa a parte de tratamento enzimático, filtragem e coloração do DEFT de forma automática, ficando de fora as partes de montagem de lâmina para a contagem de forma automática, como pode se visto na Fig. 11, no detalhe do microscópio de epifluorescência separado da unidade principal conclui-se, desse modo, que existe uma transferência do filtro, ou o que quer que usem para o isolamento das bactéria, da unidade principal para o microscópio de forma manual. O COBRA processa aproximadamente 100 amostras por hora, mas os resultados só se disponibilizam depois de uma hora[10].

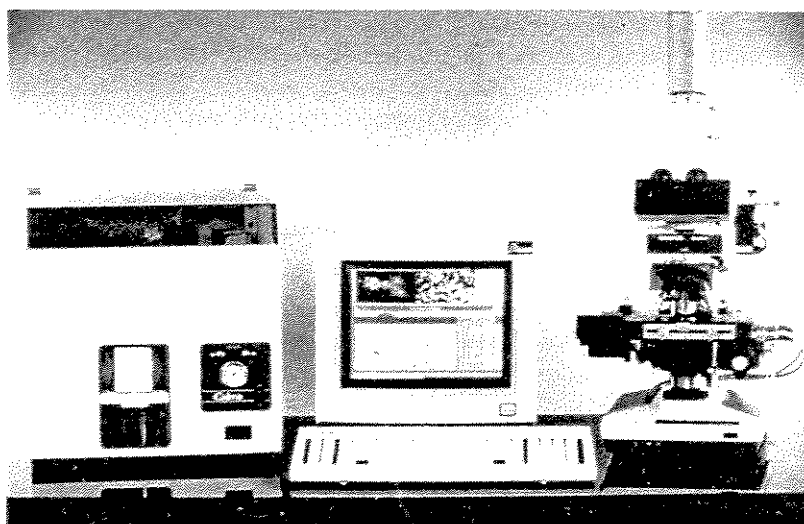


Figura 11 - COBRA / DEFT da *Biocom*

A Fig. 12 mostra também um teste de correlação entre o COBRA e a Contagem em placas mostrando um coeficiente de correlação de $r = 0.81$, considerado razoável [11, 12].

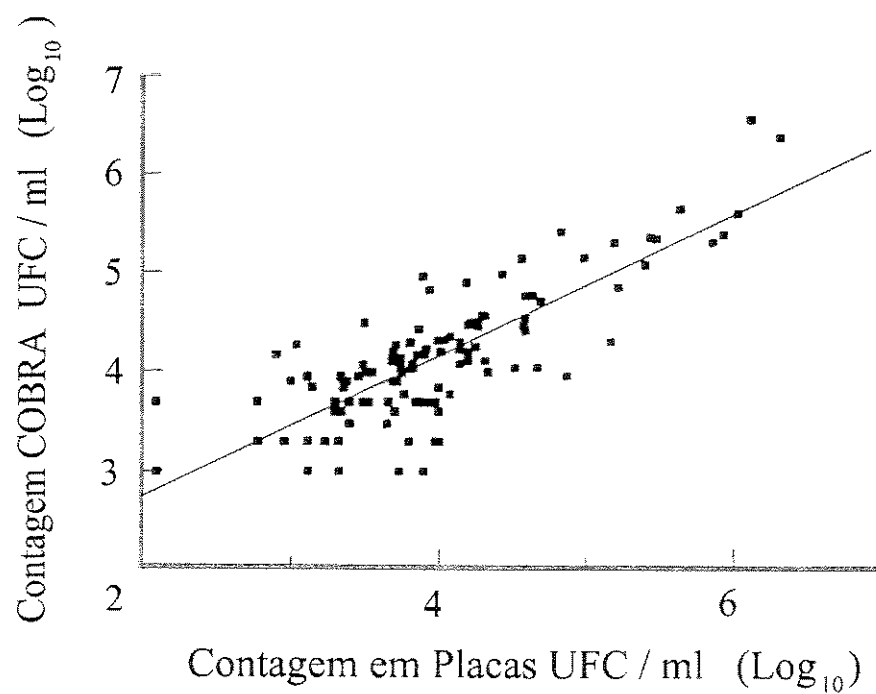


Figura 12 - Correlação entre COBRA e Contagem em placas para bactérias viáveis.

Equação de regressão linear: $y = 1.39 + 0.69x$

Coefficiente de Correlação: $r = 0.81$

CAPÍTULO 3 - ENSAIOS PRELIMINARES

Os ensaios com a contagem padrão e o DEFT foram importantes para que se pudesse tomar contato com todo o aparato necessário para a metodologia e ter a noção exata do tempo gasto para o tipo de análise e também da manipulação do material que envolve cada procedimento.

3.1 - MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACAS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU E PASTEURIZADO

Para realizar este tipo de análise em leite cru, foram necessários:

- Autoclave Universal - *Fabbe Primar Ind. Ltda.*
- Câmera de fluxo laminar - *Veco horizontal - Mod. VLFS-12*
- Incubadora - *Fabbe - Mod 169*
- Destilador de água
- Forno de Microondas
- Balança de precisão analítica - *Scientech - Mod SA210D*
- Geladeira
- Água salina peptonada H_2O_{sp}
- Agar padrão para contagem em placas(PCA)
- Pipetas de 10ml e 1ml
- 9 tubos de ensaio
- 3 frascos de 90ml esterilizados
- 2 frascos de 200ml esterilizados

- 20 placas de contagem de colônias ou placas de Petri esterilizadas

Todo o material descrito foi disponibilizado inicialmente pelo Laboratório de Tecnologia de Alimentos para adaptação, conhecimento e domínio do método por parte dos membros da equipe de Microeletrônica da Faculdade de Engenharia Elétrica de Computação para posterior aplicação do método no Laboratório de Termobacteriologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos, para comparação dos métodos.

3.1.1 - ÁGUA DE DILUIÇÃO

De acordo com a Tabela 3, foram realizadas as diluições com água destilada deionizada, previamente estabelecidas para os diferentes tipos de leite nela citados. Esta água é pipetada em 10 tubos de ensaio com tampa, sendo 9 ml para cada tubo (Fig. 4) e em mais 3 frascos com 90 ml, também tampados, para posteriormente serem submetidos a autoclavagem.

Tabela 3 - Diluições para leite "A", "C" pasteurizado e Cru para Leite "B".

Leite		Diluições			
Cru	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
"A"	10^0	10^{-1}	10^{-2}	-	
"C"	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	-	

3.1.2 - *PREPARO DO (PCA)*

Para este trabalho foi utilizado um “PCA” de marca *Oxoid*, para a contagem total de aeróbios mesófilos. Para a preparação do meio foram seguidas as instruções do fabricante (4,7 gramas de PCA / 400 ml de água destilada deionizada, PH 7,0).

Depois de diluído este PCA foi acondicionado em frascos para ser autoclavado, podendo ser conservado em geladeira por até 30 dias. Antes do uso o mesmo foi previamente fundido e resfriado a 45⁰C.

3.1.3 - *AMOSTRA*

Para este ensaio foram adquiridas amostras de leite cru padrão "B", 4 horas depois da ordenha, em uma cooperativa da região de Campinas na parte da manhã de um caminhão isotérmico, acondicionadas em dois frascos de 500 ml estéreis e conduzidas ao laboratório no prazo de 40 minutos à temperatura de 5⁰C .

As amostras de leite "A" e "C" pasteurizados e devidamente refrigerados foram adquiridas no mercado, ambas em seu último dia de validade.

Seguindo as recomendações da metodologia em 2.1 e com diluições indicadas na Tabela 3, os critérios de escolha para o resultado definitivo foram os indicados em 2.1.2 e por isso os resultados em negrito na Tabela 4 foram aqueles selecionados para o cálculo [13 , 7].

3.1.4 - CONTAGEM

Com as recomendações de (2.1.4) procedeu-se a contagem do ensaio preliminar desta contagem com os resultados apresentados a seguir.

Fazendo a média aritmética das duplicatas:

$$\{(1.a Amostra) + (2.a Amostra)\} \cdot \frac{1}{2} = \text{UFC} / \text{ml} \quad (3.1)$$

Tabela 4 - Dados para Contagem em placas

TIPO DE LEITE	DILUIÇÕES / UFCs				UFCs/ml
Cru	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
1.a Amostra	Incontável	73	7	1	7.8×10^3
2.a Amostra	Incontável	83	9	1	
"A"	10^0	10^{-1}	10^{-2}	-	
1.a Amostra	26	13	3	-	26.5×10^0
2.a Amostra	27	16	4	-	
"C"	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	-	
1.a Amostra	Incontável	135	19	-	1.5×10^4
2.a Amostra	Incontável	172	13	-	

O leite cru e as duas amostras pasteurizadas, apesar de estarem em seu último dia de validade, encontravam-se dentro da faixa de contagem recomendada pela legislação.

3.2 - MÉTODO "DEFT" EM AMOSTRA DE LEITE CRU

Foram gastos aproximadamente 8 semanas somente para se conseguir o domínio da técnica na parte de tratamento enzimático, devido à dificuldade no trabalho com a tripsina. O tratamento enzimático deste método é, sem dúvida, o ponto crítico e o principal motivo das desistências do trabalho em instituições como o Depto. de veterinária de UEL (Universidade Estadual de Londrina) e o Depto. de farmácia da USP (Universidade de São Paulo), que também resolveram trabalhar com essa técnica.

Por meio de uma pesquisa mais aprofundada, juntamente com um especialista em enzimas da Faculdade de Engenharia de Alimentos, foi possível uma inovação nesta parte do método descrito por Pettipher. Só depois disso chegou-se a bons resultados.

Esta modificação estará descrita no (3.2.7).

3.2.1 - MATERIAIS:

O material requerido para todo o procedimento compõe-se de:

- Uma torre de filtração p/ filtro de 25mm de diâmetro em aço inox
- Enzima - Tripsina Reidratada "DIFCO"
- Triton X-100 "VETEC"
- Citrato do Sódio Dihidrato "MERCK"
- Ácido Cítrico "MERCK"
- Acridine Orange "SIGMA"
- Filtro de Policarbonato 0,6 microns 25 mm "MILLIPORE"

- Filtro em ester de celulose 0.22 microns 25 mm "*MILLIPORE*"
- Abrilhantador Fluorescente - Tinopal "*SIGMA*"
- Álcool Isopropílico (PA)
- Uma bomba de vácuo (100 kPa)
- Balança de precisão analítica – *Scientech – Mod. SA210D*
- Pipetas de 1, 2, 5 e 10 ml
- Banho Maria
- Lâminas de 75 x 26 mm
- Lamínulas de 24 x 30 mm
- Tubos de ensaio estéreis
- Um microscópio confocal configurado para epifluorescência - Zeiss - Mod. Axiovert 100

3.2.2 - PREPARO DOS REAGENTES:

O *Triton X-100* / 0.1% e o *Triton X-100* / 0.5% executam a função de um detergente no procedimento e foram obtidos fazendo-se as seguintes diluições:

0,1 ml de *Triton X-100* / 100 ml de água deionizada;

0,5 ml de *Triton X-100* / 100 ml de água deionizada.

Para o preparo dos tampões citrato (pH 6,6 e pH 3,0) é necessária a prévia preparação do ácido cítrico diluído, para acerto do pH do tampão. Dessa forma as diluições utilizadas foram as seguintes:

Ácido Cítrico 210,14 / 1000 ml de água destilada para 1 M.

Ácido Cítrico 21,014 / 1000 ml de água destilada para 0,1 M.

Citrato de Sódio 29,410 / 1000 ml de água destilada.

No preparo do corante Acridine Orange, 0,025 gramas do mesmo foram diluídos em 100 ml de tampão citrato, pH 6,6 e homogeneizados com o abrillantador fluorescente diluído a (0,025 g. / 100 ml de água destilada). A função deste abrillantador, depois de ser adicionado ao corante, é dar maior realce à fluorescência das bactérias. Este corante pode ser armazenado por até três dias, sem a perda de suas características [14].

No preparo da tripsina reidratada (Difco), 1g. foi diluído em 50 ml de água deionizada. Todos os reagentes descritos, depois de devidamente preparados, foram filtrados por meio de um filtro de 0,22 microns de celulose com a finalidade de esterilização e retirada de partículas que podem se transformar em "debris" na filtragem final e coloração.

3.2.3 - TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Por se tratar de um processo de filtração, a amostra é submetida a um tratamento enzimático, cuja função é agredir as células, quebrando suas paredes e eliminando partes indesejáveis do leite como: glóbulos de gordura, caseínas, proteínas, células somáticas, que são partes do leite extremamente grandes quando comparadas ao tamanho das bactérias. Este tratamento é feito do seguinte modo: processa-se a homogeneização de 2 ml de triton X-100 (0.5%); 0.5 ml de tripsina reidratada e 2 ml de leite cru em um tubo estéril e incuba-se em banho maria à temperatura de 50°C por um período de 10 (dez) minutos.

3.2.4 - TORRE DE FILTRAÇÃO:

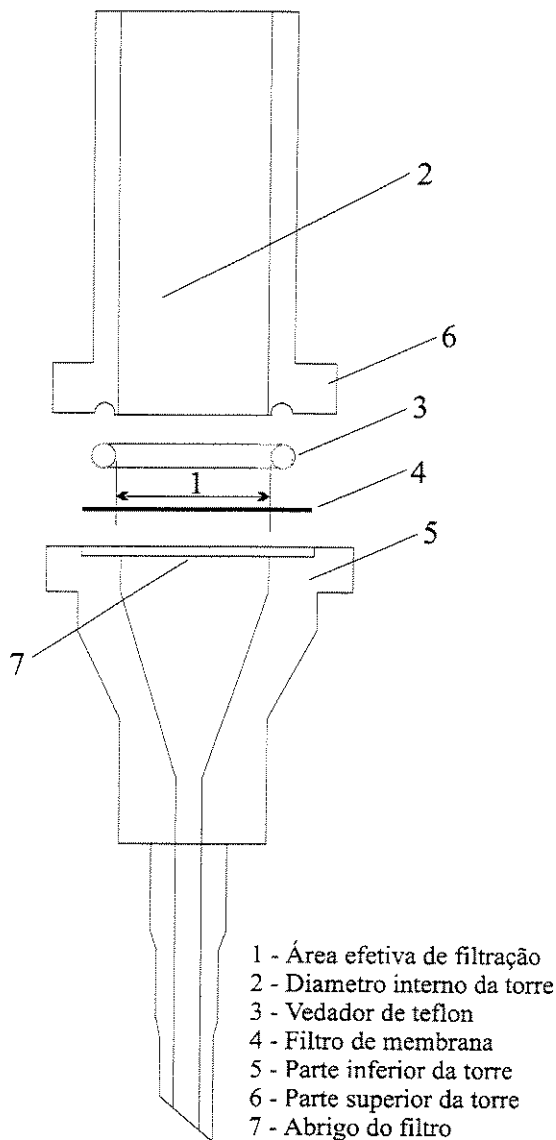


Figura 13 - Torre de filtração

Projetada pelo Departamento de Microeletrônica e o Departamento de Ciência de Alimentos, esta torre trás algumas diferenças com relação às torres convencionais, utilizadas na maioria dos experimentos realizados com esta técnica, em nível mundial.

A matéria prima para sua construção foi o aço inox 306, material comprovadamente superior a qualquer outro tipo que se tentou utilizar nesta técnica, como por exemplo o vidro sinterizado [5, 15, 20]. A nova medida no diâmetro interno (2) de *18mm com tolerância de +0,03mm* foi feita para garantir uma cobertura total da área de filtração sobre o filtro de membrana (4), mesmo com a colocação de pequenas quantidades de reagentes no interior da torre. A alteração da área efetiva de filtração (1) para *19,5mm de diâmetro*, a

modificação no sistema de fixação da parte inferior (5) com a parte superior (6) da torre e o sistema de montagem da tela de abrigo do filtro (7), que permite a troca rápida em caso de dano na tela fina de aço inox, foram as principais modificações no projeto inicial. A função desta torre é abrigar um filtro de policarbonato (4) de póro 0.6 microns juntamente com um vedador de teflon (3) onde ficarão retidas as bactérias do leite.

3.2.4.1 - FUNCIONAMENTO DA TORRE DE FILTRAÇÃO

Com uma torre de filtração previamente preparada com o filtro de membrana de polycarbonato e após os 10 minutos de incubação do tratamento enzimático, 5 ml de Triton X-100 (0,1%), previamente aquecido a $50^{\circ}C$, é colocado sobre o filtro e a bomba de vácuo de 100 kPa é acionada, e com a bomba ainda ligada coloca-se a amostra incubada, aguarda-se a passagem pelo filtro e em seguida mais 5 ml de Triton X-100 (0,1%) aquecido a $50^{\circ}C$, desligando a bomba, assim que todo o reagente no interior da torre tiver passado pelo filtro.

3.2.5 - COLORAÇÃO E MONTAGEM DO FILTRO

O processo de coloração inicia-se assim que termina o processo de filtração e isolamento das bactérias que ficam retidas no filtro. Na técnica de coloração, foram aplicados 2 ml do corante acridine orange, já preparado, e depois de 2 (dois) minutos de sua atuação é acionada a bomba de vácuo para retirada do excesso de corante. Durante esta operação, com a bomba acionada, 2,5 ml de uma solução de tampão citrato 0,1 M pH 3,0 e 2,5 ml de álcool isopropílico (PA) foram utilizados para o enxágüe.

O filtro foi então retirado da torre para uma rápida secagem ao ar livre e em seguida procedeu-se a montagem do mesmo sobre uma lâmina e coberto com uma lamínula. Uma pequena gota de óleo de imersão utilizado na objetiva do microscópio foi colocada sobre o filtro para melhor observação no microscópio (Fig. 14).

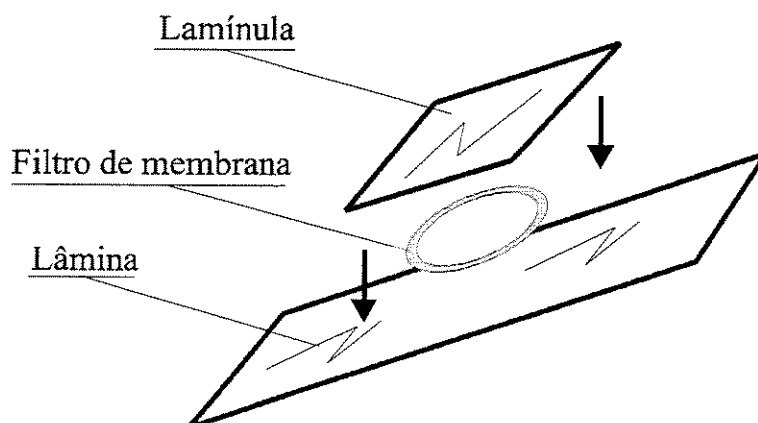


Figura 14 - Montagem do filtro para a visualização no microscópio

3.2.6 - CONTAGEM

Seguindo todas as recomendações do Capítulo 2 (2.2), obteve-se os resultados apresentados na Tabela 4 que traz a contagem de bactérias de cada um dos 15 campos aleatórios percorridos com a objetiva do microscópio sobre lâmina com a membrana de polycarbonato. Obtém-se a Contagem DEFT em UFC/ml fazendo-se o produto do resultado da somatória do número de microorganismos viáveis por campo (*NMVC*) dividido por "*n*" número de contagens, pelo Fator Microscópico (*FM*) [8, 9]. A equação (3.2) demonstra esta operação, na qual o *NMVC* será dado em UFCs:

$$\left(\frac{\sum NMVC}{n} \right) \cdot (FM) = UFC / ml \quad (3.2)$$

onde o resultado da razão da equação anterior é expresso em UFCs.

Tabela 4 - Contagem de microrganismos em 15 campos de amostra de leite cru "B"

CAMPO	N.o de microrganismos por campo	Área do campo do microscópio mm ²
1	32	0.0201mm ²
2	50	"
3	120	"
4	35	"
5	50	"
6	50	"
7	40	"
8	35	"
9	43	"
10	70	"
11	75	"
12	75	"
13	216	"
14	120	"
15	90	"

Em 3.2 teremos
$$\frac{\sum NMVC}{n} = UFCs \quad (3.3)$$

No cálculo do Fator Microscópico a área efetiva de filtração em mm² é dada por: $\pi \cdot r^2 = \pi \cdot 9.75^2 = 298.6mm^2$ e a área do campo do microscópio em mm² na equação (3.4), depende do diâmetro de visão da objetiva. O fator microscópico é uma correção na contagem que pode variar de acordo com o fabricante de objetivas e a quantidade de amostra utilizada.

Foi utilizado no experimento uma objetiva de marca "ZEISS" 100x de imersão em óleo com diâmetro de 0,16mm de campo de visão [18].

Portanto $\pi \cdot r^2 = \pi \cdot 0.08^2 = 0.0201mm^2$

$$FM = \frac{\text{Área..efetiva..de..filtração..mm}^2}{\text{Área..do..campo..do..microscópio..mm}^2 \cdot \text{Amostra..em..ml}} \quad (3.4)$$

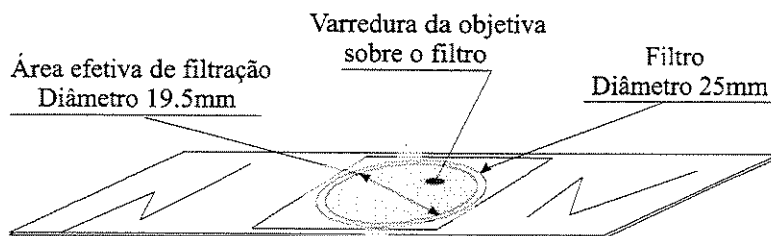


Figura 15 - Filtro de polycarbonato montado sobre a lâmina

Aplicando (3.3) de acordo com a Tabela 4 obtém-se:

$$\frac{\sum NMVC}{n} = \frac{1101}{15}$$

E também aplicando (3.4) de acordo com as dimensões do filtro e da objetiva utilizada obtém-se:

$$FM = \frac{298.6mm^2}{0.0201mm^2 \times 2ml}$$

Logo, fazendo uso da equação (3.2) obtém-se:

$$\frac{1101}{15} UFC \cdot \frac{298.6mm^2}{0.0201mm^2 \times 2ml}$$

onde:

$$(73,4) \cdot (7429) \cong 5.45 \cdot 10^5 UFC / ml$$

3.2.7 - UTILIZAÇÃO DO MICROSCÓPIO DE ECPIFLUORESCÊNCIA

Foi utilizado para a contagem de microrganismos um microscópio "ZEISS - Mod. Axiovert 100", com uma configuração de epifluorescência, acoplado a um micro computador equipado com o *Laser Sharp - software* para aquisição de imagens por meio de varredura a "laser" em plataforma OS 2. Os microscópios com fontes de luz equipadas com

lâmpadas de xenônio de 100 watts são os que respondem melhor na faixa do espectro usada neste trabalho [10]. No microscópio utilizado nesta pesquisa, a lâmpada utilizada foi a de mercúrio de 50 watts, o que não causou nenhum tipo de prejuízo pois a deficiência da fonte de luz era compensada pelo aumento da intensidade do sinal de "*laser*", obtendo-se assim ótimos resultados.

3.2.8 – INOVAÇÃO NO PROCEDIMENTO

A temperatura em excesso é altamente prejudicial à flora bacteriana do leite [4]. No entanto, cumprindo a risca todo o procedimento de Pettipher [8], foi detectada uma falha no tratamento enzimático quando se trabalha com amostras de leite com diferentes temperaturas.

A enzima utilizada no trabalho possui uma temperatura ótima de trabalho de 50°C e, ao se utilizar amostras com temperatura muito diferente da temperatura de trabalho da enzima, parte do tempo de incubação do procedimento é tomado para o equilíbrio de temperatura, prejudicando a eficiência do tratamento enzimático sobre a amostra. O resultado disso é a presença de muitos "*debris*", partes do leite que não foram atacadas devido à ineficiência do tratamento enzimático, como mostrado na Fig. 16-A

A solução encontrada para o problema foi a colocação de toda a amostra a ser analisada pelo método DEFT à mesma temperatura do melhor desempenho da enzima por meio de um banho maria a 50°C por exatos 5 (cinco) minutos, tomando extremo cuidado para que não se exceda este tempo e esta temperatura, sob pena de ter comprometida parte da flora bacteriana da amostra. Estes novos procedimentos no DEFT deram ótimos resultados, conforme pode ser visto na Fig. 16B, com a boa nitidez das bactérias a serem contadas.

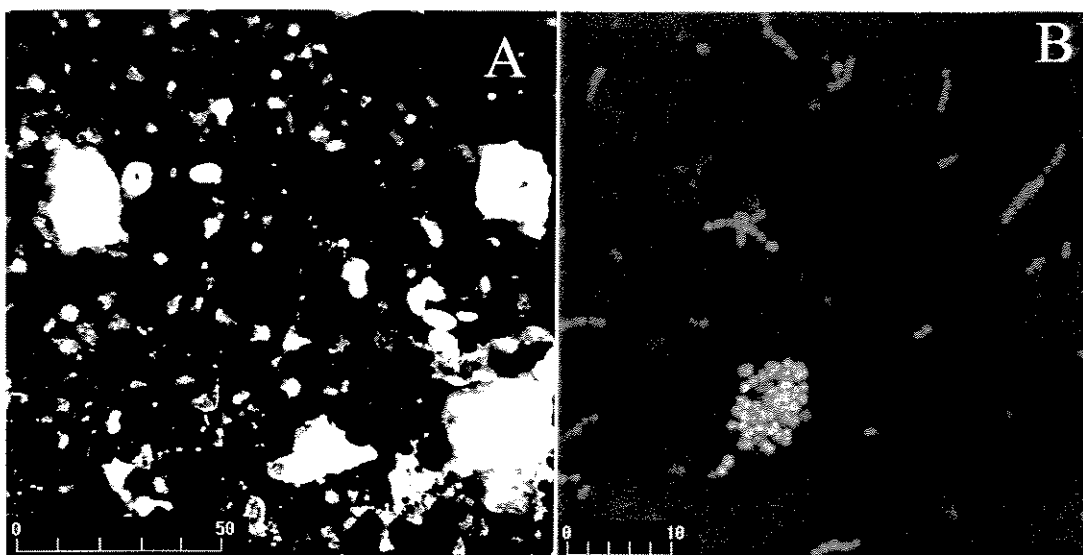


Figura 16 - Em "A" a imagem microscópica de um campo na membrana de filtragem com atuação ineficiente da enzima e em "B", com a inovação no método com uma boa atuação enzimática

3.2.9 - IMAGENS DE BACTÉRIAS

As próximas páginas apresentam fotos nítidas de algumas formas bacterianas normalmente encontradas em leite cru "B". A Fig. 17 mostra imagens de uma amostra que, se comparada a literatura consultada, (Fig. 2), poderia se identificar o tipo de agrupamento deste microrganismo como sendo um *diplococcus* [6].

Sempre comparando com as Fig. 1 e 2, a Fig. 18 apresenta um agrupamento de *coccus* com um tamanho aproximado de 0.8 micron.

A Fig. 19 traz um agrupamento que se assemelha muito ao *streptococcus* ou *lactococcus*, e o que se pode notar nesta imagem é que nem todo o agrupamento é composto de

células viáveis onde no meio da corrente de bactérias da figura pode se ver alguns microrganismos fluorescendo na cor verde. A Fig. 20 mostra de forma muito nítida um agrupamento que pode ser identificado como *streptococcus lactis* [17]. A Fig. 21 mostra de forma mais nítida dois tipos de agrupamentos um *tetracoccus* e um provável agrupamento de células somáticas com os quais se permite fazer uma comparação visual em termos de área de uma bactéria e uma célula somática.

A Fig. 22 mostra outro agrupamento de *coccus*, desta vez fluorescendo na cor verde, que são células mortas com aproximadamente 5 microns de diâmetro.



Figura 18 - Imagem de um agrupamentos de *coccus* em leite "B".



Figura 19 - Imagem de um suposto agrupamento de *streptococcus* ou *lactococcus* em leite "B".



Figura 20 - Imagem de um suposto agrupamento de *streptococcus* em leite "B".

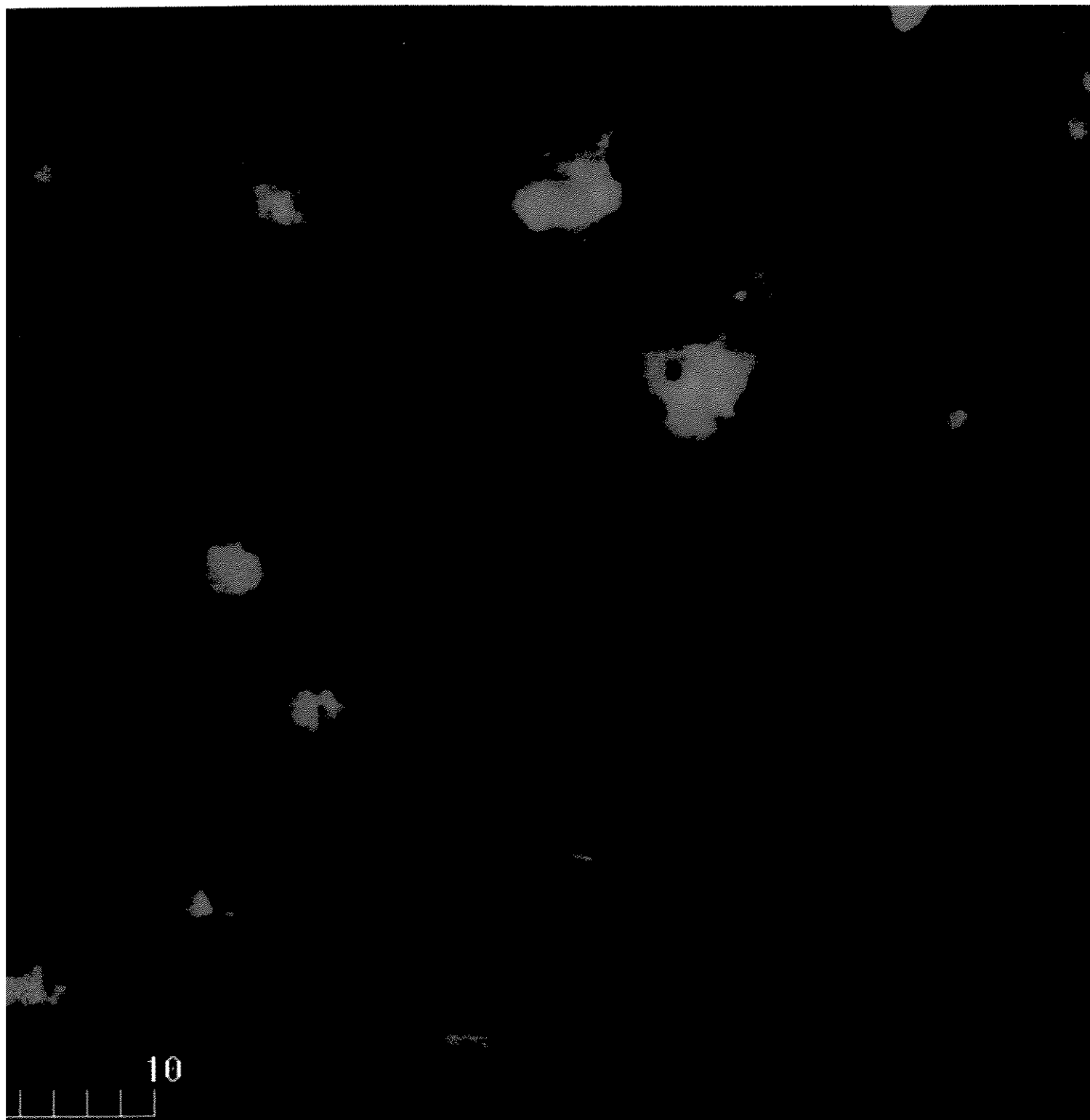


Figura 21 - Imagem de um suposto agrupamento de *tetracoccus* em leite "B".



Figura 22 - Imagem de um suposto agrupamento de *coccus* fluorescendo na cor verde, considerado como célula morta em leite "B".

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS COMPARATIVOS

As 32 (trinta e duas) amostras foram retiradas em uma cooperativa da região de Campinas da coleta individual, que o transportador faz em cada produtor, antes de colocar o leite da produção diária no caminhão isotérmico. Colocadas em tubos estéreis, as amostras com padrão para leite B foram conduzidas ao laboratório em uma caixa isotérmica (isopor) com gelo a temperatura de 3°C . Um diferencial na coleta foi o fato de os tubos estéreis terem sido antecipadamente enviados a cada um dos 32 produtores para a coleta e imediato armazenamento a temperatura de 3°C , pois na maioria dos estudos feitos as áreas de coleta eram as plataformas de recepção ou os tanques de armazenamento. Com isto foi possível verificar realmente o nível de higiene de cada produtor e evitar os riscos de contaminação, que por ventura pudesse ocorrer no transporte.

O tempo total entre a ordenha e a primeira análise foi de 7 horas. As análises foram feitas de forma simultânea, ou seja, para cada amostra coletada foi realizado um plaqueamento em duplicata e em seguida o DEFT. Todo o procedimento de plaqueamento foi feito em conformidade com as normas do MA - Ministério da Agricultura para contagem de aeróbios mesófilos em profundidade [7], em uma câmara de fluxo laminar, para evitar qualquer tipo de contaminação. Para efeito de comparação do DEFT com a Contagem em placas foram contadas somente as bactérias que fluoresceram na faixa de 650nm, ou seja, em laranja ou laranja avermelhado

4.1 – CONTAGEM EM PLACAS DE LEITE CRU "B"

Os procedimentos seguidos foram os descritos no Capítulo 3 (3.1), no qual também foi feito o uso da contagem em placas em profundidade. A Tabela 5 mostra os resultados de (32) trinta e duas amostras de leite cru onde fez-se uso da equação (3.1) para obtenção dos resultados. As diluições plaqueadas foram (10^2), (10^3) e (10^4) em duplicatas, o suficiente para a detecção dos limites estabelecidos pela legislação para o leite "B" que é de 500.000 UFCs [1].

Tabela 5 - Resultados de 32 amostras de leite tipo "B".

CONTAGEM EM PLACAS				
N.o da análise	Diluição	Contagem (1)	Contagem (2)	UFC/ml
1	10^{-3}	27	23	$2.5 \cdot 10^4$
2	10^{-3}	30	26	$2.8 \cdot 10^4$
3	10^{-2}	106	112	$1.09 \cdot 10^4$
4	10^{-2}	127	140	$1.33 \cdot 10^4$
5	10^{-3}	28	27	$2.75 \cdot 10^4$
6	10^{-3}	59	51	$5.5 \cdot 10^4$
7	10^{-3}	26	48	$3.7 \cdot 10^4$
8	10^{-3}	62	54	$5.8 \cdot 10^4$
9	10^{-4}	45	46	$4.5 \cdot 10^5$
10	10^{-3}	90	94	$9.2 \cdot 10^4$
11	10^{-4}	23	26	$2.45 \cdot 10^5$
12	10^{-2}	121	131	$1.26 \cdot 10^4$
13	10^{-2}	164	174	$1.69 \cdot 10^4$
14	10^{-4}	34	36	$3.5 \cdot 10^5$
15	10^{-3}	204	221	$2.12 \cdot 10^5$
16	10^{-4}	30	24	$2.7 \cdot 10^5$
17	10^{-3}	230	210	$2.2 \cdot 10^5$
18	10^{-4}	30	29	$2.95 \cdot 10^5$
19	10^{-4}	23	29	$2.6 \cdot 10^5$
20	10^{-3}	205	235	$2.2 \cdot 10^5$
21	10^{-3}	42	28	$3.5 \cdot 10^4$
22	10^{-4}	33	26	$2.9 \cdot 10^5$
23	10^{-4}	25	28	$2.65 \cdot 10^5$
24	10^{-4}	48	54	$5.1 \cdot 10^5$
25	10^{-2}	89	87	$8.8 \cdot 10^3$
26	10^{-2}	100	103	$1.01 \cdot 10^4$
27	10^{-3}	131	149	$1.4 \cdot 10^5$
28	10^{-3}	177	218	$1.9 \cdot 10^5$
29	10^{-3}	29	26	$2.75 \cdot 10^4$
30	10^{-4}	41	37	$3.9 \cdot 10^5$
31	10^{-3}	56	46	$5.1 \cdot 10^4$
32	10^{-4}	38	37	$3.75 \cdot 10^5$

4.2 - CONTAGEM COM O "DEFT" DE LEITE CRU "B"

A Tabela 6 mostra os resultados com as mesmas (32) trinta e duas amostras da Tabela 5, usando para este procedimento as equações (3.2), (3.3) e (3.4). Para cada número de análise da tabela foram realizadas 15 contagens em cada filtro para a obtenção do (NMVC).

$$\text{O FM - Fator Microscópico} = 7429 / ml$$

Tabela 6 - Resultado de 32 amostras de leite tipo "B" - DEFT

DEFT		
Número da Análise	Média do n.º microrgan. viáveis por campo - UFC	Resultado em UFC/ml
1	19.53	$1.4 \cdot 10^5$
2	16.66	$1.2 \cdot 10^5$
3	16.53	$1.2 \cdot 10^5$
4	14.66	$1.08 \cdot 10^5$
5	16.06	$1.19 \cdot 10^5$
6	38.13	$2.8 \cdot 10^5$
7	40.53	$3.0 \cdot 10^5$
8	59.53	$2.42 \cdot 10^5$
9	12.8	$9.5 \cdot 10^4$
10	59.63	$4.4 \cdot 10^5$
11	69.25	$5.1 \cdot 10^5$
12	9.73	$7.22 \cdot 10^4$
13	18	$1.33 \cdot 10^5$
14	43.33	$3.2 \cdot 10^5$
15	66.71	$4.95 \cdot 10^5$
16	69.16	$5.13 \cdot 10^5$
17	72.75	$5.8 \cdot 10^5$
18	83.6	$6.2 \cdot 10^5$
19	67.733	$5.03 \cdot 10^5$
20	84.06	$6.24 \cdot 10^5$
21	15.66	$1.16 \cdot 10^5$
22	73.40	$5.4 \cdot 10^5$
23	41.66	$3.09 \cdot 10^5$
24	86.40	$6.41 \cdot 10^5$
25	4.26	$3.16 \cdot 10^4$
26	6.13	$4.55 \cdot 10^4$
27	23.6	$1.75 \cdot 10^5$
28	18.6	$1.38 \cdot 10^5$
29	15.2	$1.12 \cdot 10^5$
30	25.2	$1.8 \cdot 10^5$
31	6.2	$4.6 \cdot 10^4$
32	80.33	$2.44 \cdot 10^5$

Com os dados das Tabelas 5 e 6 levados a um *software* para cálculos estatísticos, *ORIGIN Version 5 - Micronal Software, Inc.*, pode se traçar um gráfico para se ter uma noção da dispersão dos pontos em um plano cartesiano e ao mesmo tempo calcular rapidamente a equação de regressão linear e uma correlação entre os dois métodos. Cada ponto da Fig. 23, corresponde à análise de uma amostra de leite cru feita em DEFT e em Contagem em placas.

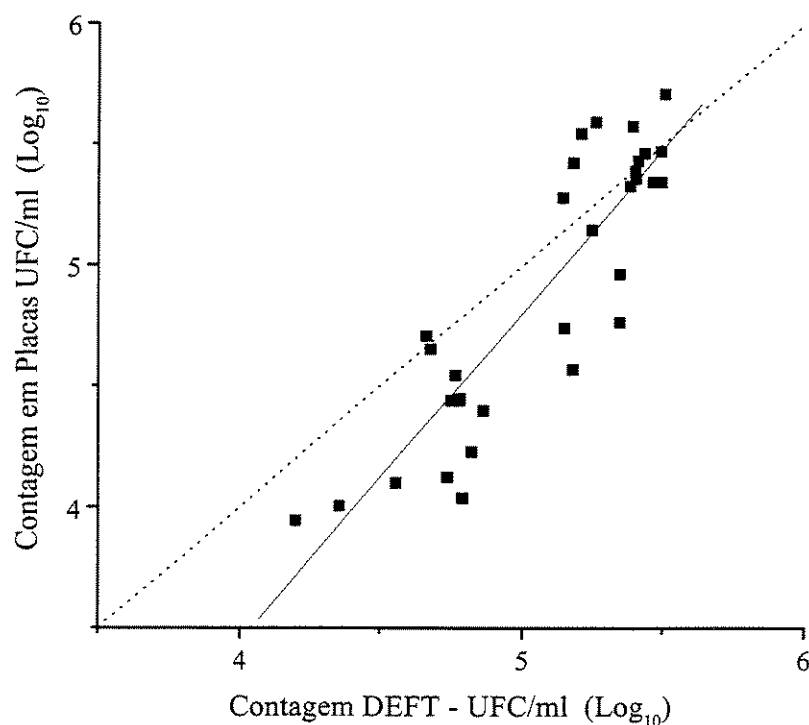


Figura 23 - Correlação entre o DEFT e Contagem em Placas para as bactérias viáveis.

Equação de regressão linear: $y = -2.00691 + 1.3619x$

Coefficiente de Correlação $r = 0.88$

4.3 - ESTUDO DE DISPERSÃO

Devido à dispersão dos dados no gráfico da Fig. 23, considerada exagerada para leite cru "B", foi feito um estudo rápido com o auxílio do mesmo software, para simular o comportamento das amostras em separado sob a mesma temperatura dos tanques de armazenagem 4°C. Assim pode-se constatar como cada amostra está se comportando com relação ao crescimento bacteriano. Com o leite cru armazenado a esta temperatura, normalmente a multiplicação bacteriana é desacelerada a quase zero por até 24 horas, que é o período da adaptação dos microrganismos ou fase estacionária [5]. Algumas amostras do trabalho foram submetidas à contagem no *tempo zero "O"*- hora da chegada ao laboratório, e depois em 6 horas, sendo que neste intervalo as amostras foram incubadas a 4°C, simulando assim a temperatura de armazenamento em que teoricamente devem ser mantidos os tanques de um beneficiador de leite. Alguns resultados obtidos contrariam em parte a literatura, já que foram notados alguns crescimentos significativos em várias amostras em apenas 1/4 do tempo previsto pela literatura para a uma estabilização no crescimento bacteriano em Contagem em placas e no DEFT deste trabalho, com uma relação *População bacteriana em UFCs x Horas de incubação*.

Convém salientar que o objetivo principal do trabalho é o domínio da técnica para uma futura automatização e não um estudo de forma profunda na área da microbiologia. Por isso é que foram feitas somente 32 amostras, o suficiente para suprir as necessidades do trabalho.

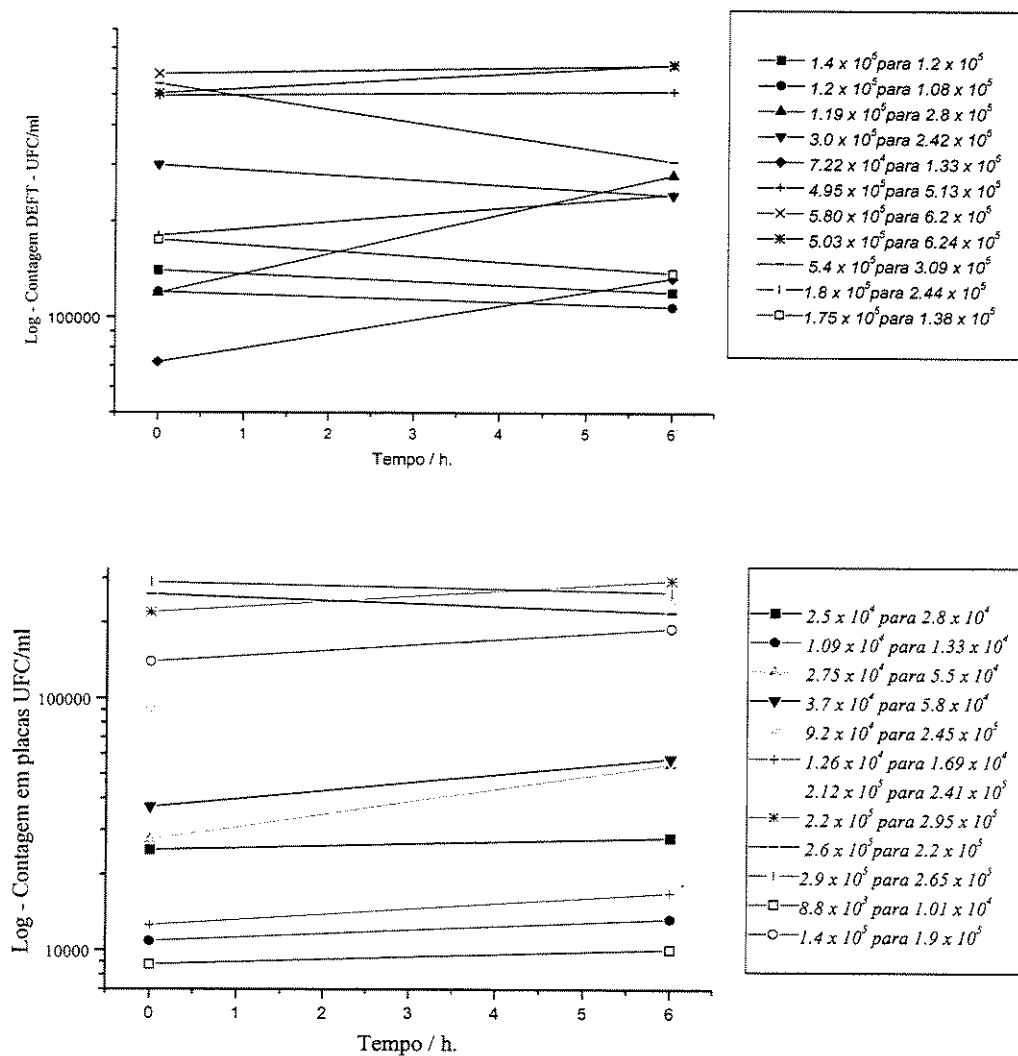


Figura 24 - Evolução da população bacteriana em 6 horas de incubação a 4⁰C, na fase estacionária.

CAPÍTULO 5 - PROPOSTA DE AUTOMATIZAÇÃO DO "DEFT"

5.1 - INTRODUÇÃO

A Fig. 25 apresenta um diagrama esquemático de uma possível implementação do processo de contagem proposto depois de aproximadamente 12 meses destinados ao domínio e ensaios com as duas técnicas de contagem, diretamente envolvidas no projeto para a automatização. O que se pretende com este projeto é que este sistema se coloque, em termos de qualidade, entre o *Bactoscan* dinamarquês e o *Cobra* francês. Isto porque este trabalho propõe a total automatização do procedimento DEFT, pois nenhum dos dois sistemas, pesquisados e comercializados, executa esta tarefa de forma integral, apesar de terem o mesmo princípio de funcionamento.

O sistema aqui proposto é dividido em 6 unidades, sendo uma delas a unidade central de comando para as outras 5 que são:

A - *Unidade de Controle Central Microprocessada*, que terá um microprocessador como o responsável pela execução de todos os comandos da Lógica de Controle de cada unidade e ao mesmo tempo estará ligada ao microcomputador do sistema.

B - *Unidade de Preparo e Coleta da Amostra*, local onde a amostra de leite cru será colocada em condições para ser submetida à análise.

C - *Unidade de Incubação*, onde a amostra receberá o tratamento enzimático.

D - *Unidade de Filtragem e Coloração*, local onde serão eliminadas da amostra as partes atacadas pelo tratamento enzimático por meio de uma linha de vácuo e filtragem.

E - *Unidade de Preparo para Visualização*, que constará de transdutores de posição, mesa de movimentos aleatórios e um microscópio de epifluorescência configurado somente para este fim.

F - *Unidade de Contagem e Tratamento de Imagem*, setor onde poderá se visualizar e contar as bactérias.

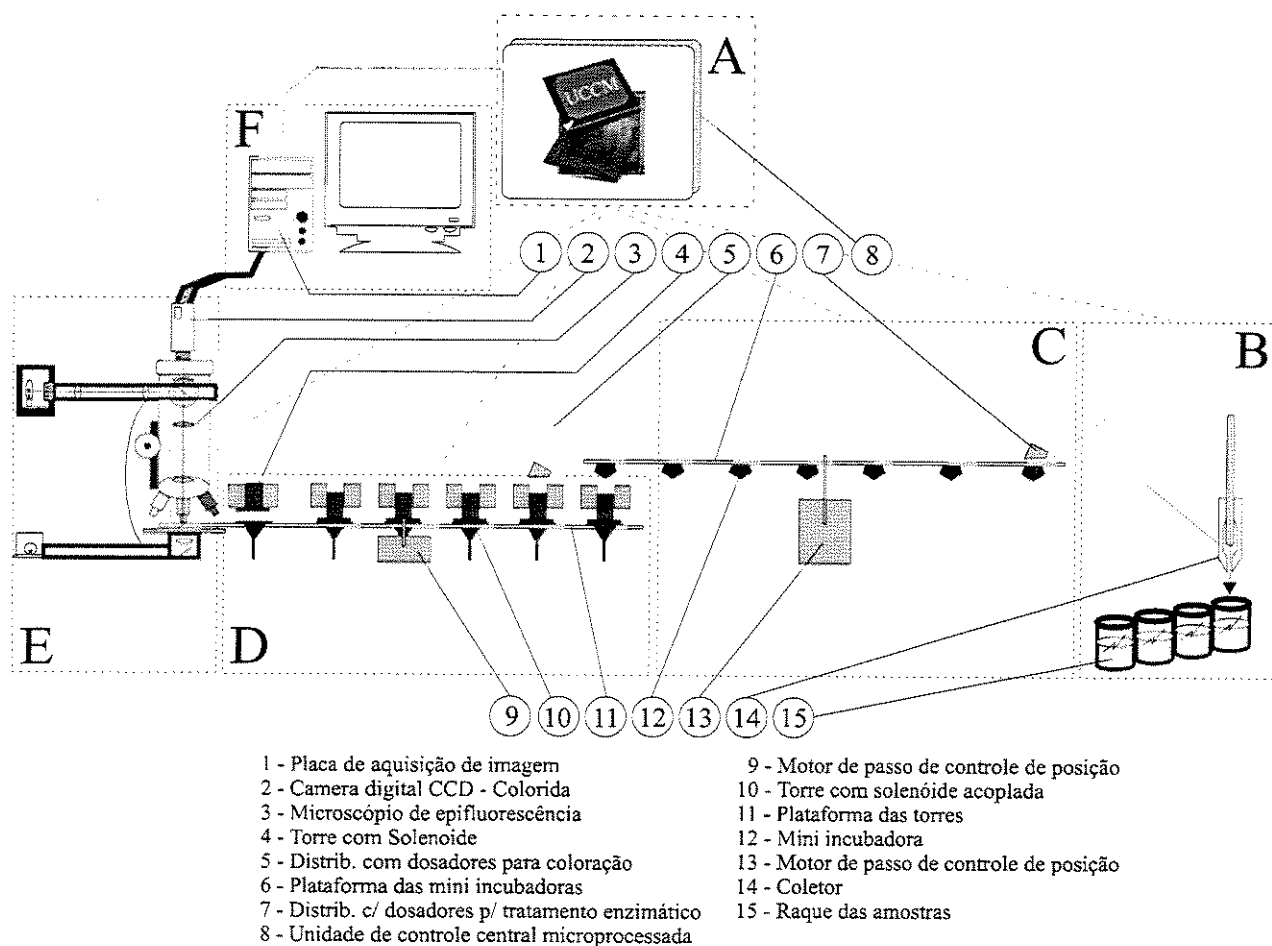


Figura 25 - Automação do processo DEFT

Como já mencionado, leva-se cerca de 30 minutos para se obter o resultado desta técnica; sendo assim, a proposta é montar um sistema *pipeline* com 10 sistemas iguais trabalhando seguidamente em plataformas circulares, fazendo diferentes análises e separadas por

um ângulo de 36° - (6 e 11 - Fig. 24). Com esse sistema acredita-se chegar a análises concluídas em um espaço de tempo de 3 a 5 minutos.

A prevenção básica do projeto é não haver no sistema nenhum tipo de contaminação de uma análise para outra pois isto levaria o processo e as próximas contagens a resultados errôneos. Pode-se resolver esse problema com uma limpeza com solução detergente à temperatura de 70°C , água para enxágüe na mesma temperatura e ar quente, nos setores "B", "C" e "D", entre uma análise e outra. Esta limpeza deverá ser feita por meio de mangueiras, bombas peristálticas ou por CPFs - Controles Pneumáticos de Fluxo comandados pela (UCCM).

A divisão em unidades do procedimento DEFT de contagem para automatização será descrita de forma detalhada e ao mesmo tempo será proposta uma solução de funcionamento para cada parte do projeto, assim como os problemas que possam surgir.

5.2 - CARACTERÍSTICA DE CADA UNIDADE

5.2.1 - UNIDADE DE CONTROLE CENTRAL MICROPROCESSADA

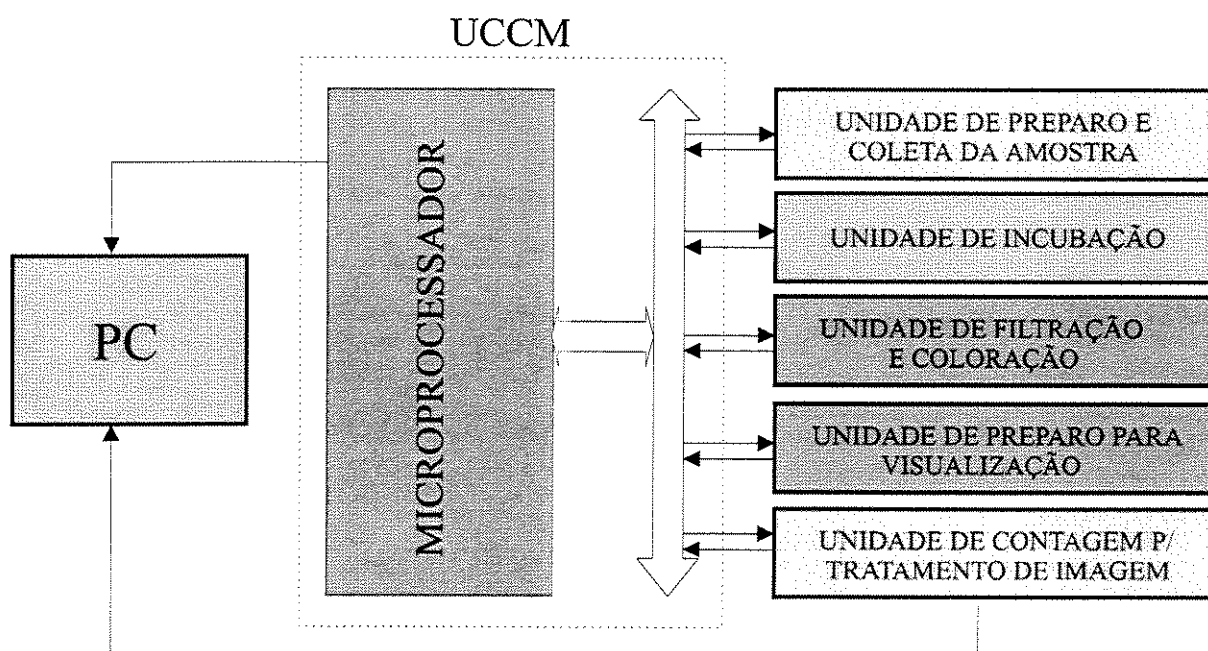


Figura 26 - UCCM e seus controles.

Esta unidade será responsável por todo o controle de acionamento mecânico das unidades a ela conectadas. Apesar de o projeto contar com um microcomputador, que poderia executar essa tarefa, decidiu-se pelo projeto desta unidade para que sejam atribuídas ao computador somente as tarefas de aquisição e tratamento de imagem. Esta unidade, além de executar essas tarefas, deverá também manter uma comunicação constante com o computador (Fig. 25).

5.2.2 - UNIDADE PREPARO E COLETA DAS AMOSTRAS

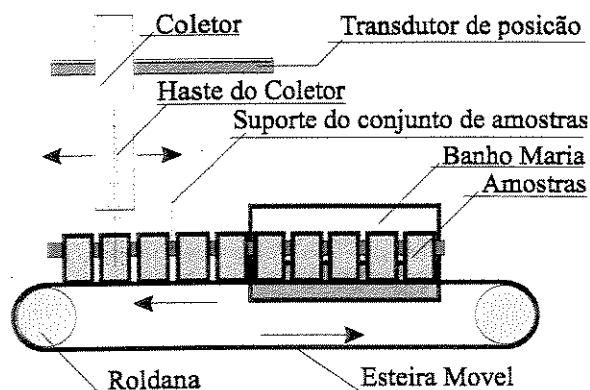


Figura 26 - Unidade de preparo e coleta de amostras

Controlado por sensores de posição que detectam os recipientes de amostra, a *Unidade de preparo e coleta das amostras* deverá compor-se de uma esteira móvel, um banho maria com temperatura controlada a 50°C , suporte do conjunto de amostras e o coletor. O suporte do conjunto de amostras é o local onde se encaixam

10 recipientes de 50 ml onde ficarão as amostras a espera da coleta. A função do banho maria é pré aquecer as amostras durante 5 minutos e, em seguida, a esteira móvel é acionada para que o suporte de amostras se mova, conforme indicam as setas da Fig. 26, até que o primeiro recipiente de amostra se posicione embaixo da haste do coletor para o procedimento de coleta. O coletor deverá ser montado sobre um transdutor de posição horizontal que fará a coleta no primeiro recipiente em seguida o coletor recolhe a haste para a rotina de limpeza e se desloca para se posicionar sobre o próximo recipiente, de amostra, repetindo este procedimento por cinco vezes.

Este banho deverá ter a sua temperatura mantida a 50°C^{+1} . A Fig. 26 mostra uma solução para o pré aquecimento de cinco em cinco amostras, mas pode se prever também o pré aquecimento de todas as amostras de uma só vez.

5.2.2.1 - FUNCIONAMENTO DO COLETOR

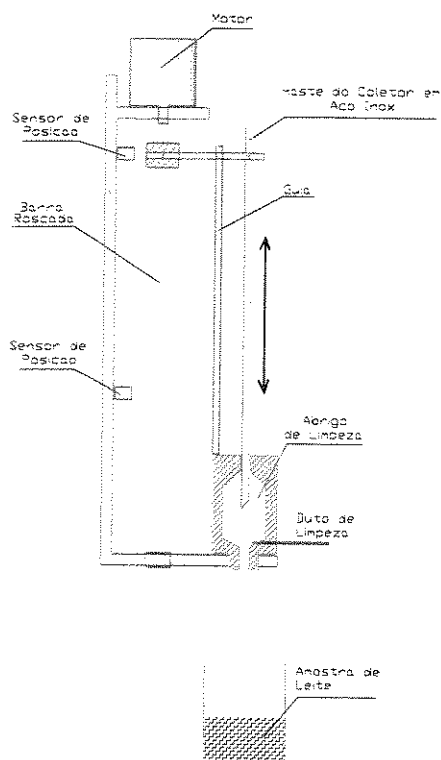


Figura 27 - Mecanismo do coletor

Montado sobre uma estrutura de ferro chato anodizado, o coletor constará de um pequeno motor DC que possa girar seu rotor tanto no sentido horário quanto no sentido anti-horário. Este motor terá seu eixo fixo a uma barra roscada que fará com que a haste do coletor, responsável pela coleta da amostra, faça o movimento de subida e descida com a velocidade determinada pelo motor.

A haste do coletor será um tubo construída em aço inox 306, redondo, com 6 mm de diâmetro externo e 3.5 mm de diâmetro interno. O controle de posição da haste será feito por dois sensores de posição que serão responsáveis pela limitação do seu percurso. A ponta superior da haste será acoplada a uma mangueira de silicone que passará por uma bomba

peristáltica controlada por um pequeno motor, ambas responsáveis pela translação da amostra dos recipientes para as mini-incubadoras, sendo que o motor de controle da bomba peristáltica deverá ser um motor que possibilite o controle de velocidade.

O traslado da amostra deverá ser rigorosamente controlado com uma precisão de 0.5 ml, para que seja possível outros tipos de calibragem da futura máquina, com a mudança de proporção da quantidade de amostra de leite no processo DEFT. No caso específico deste trabalho o processo exige que sejam transladados apenas 2 ml de amostra para mini-incubadora.

A haste, movida pelo motor e a barra roscada, deverá descer até o recipiente com a amostra de leite, e com a ponta dentro da amostra deverá executar movimentos vibratórios, (Fig. 26), durante 5 segundos para a homogeneização da amostra e, em seguida, o processo de translação do recipiente para as mini-incubadoras é executado. Terminado esse procedimento a haste do coletor precisa ser limpa imediatamente de maneira criteriosa, para que a análise posterior não seja alterada. Para isso, assim que a haste retornar a posição inicial sua ponta ficará alojada no interior de um abrigo especial para sua limpeza, (Fig. 27).

Através do duto de limpeza será injetado por meio de um CPF (Controlador Pneumático de Fluxo) 30 ml de solução detergente a 70°C, depois 30 ml de água a 70°C e, em seguida, ar quente para dentro do abrigo de limpeza, solução esta que deverá ser sugada pela mesma bomba peristáltica responsável pela translação do leite, só que agora funcionando em alta rotação para sugar a solução detergente e limpar o trajeto da amostra de leite da análise anterior, jogando em seguida esta solução para algum local destinado a descarte.

5.2.3 - UNIDADE DE INCUBAÇÃO

5.2.3.1 – DOSADOR PARA TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Este dosador será um terminal de junção de 2 reagentes químicos, Fig. 28, de lugares e temperaturas distintas, sendo estes reagentes conduzidos por meio de um CPF (Controlador Pneumático de Fluxo) ou de bombas peristálticas que se encarregará da dosagem precisa.

Dosagens:

- 0.5 ml de tripsina
- 2.0 ml de triton X-100, 0.5%

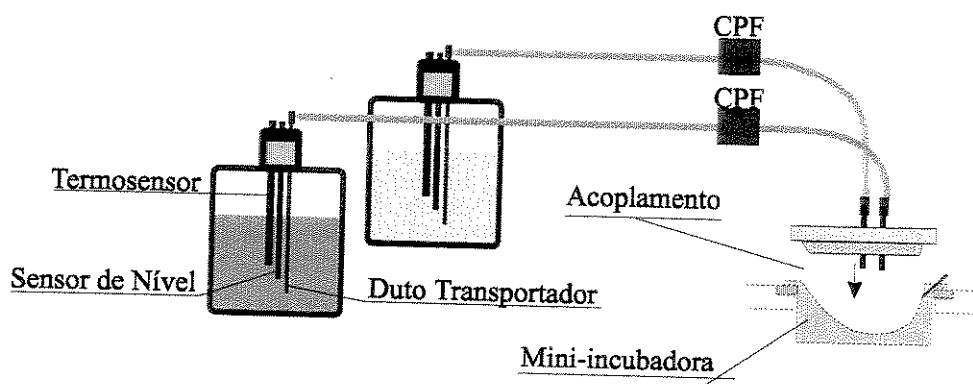


Figura 28 - Dosador e seu acoplamento

Este terminal fará um acoplamento com a mini-incubadora por meio de um pistão pneumático, onde o terminal do dosador deverá ser instalado na ponta do embolo do pistão. O formato do terminal deverá ser igual a abertura da mini-incubadora para um perfeito acoplamento, como demonstra a Fig. 28. Há dois reservatórios para os reagentes sendo um reservatório para o triton X 100 - 0,5% que deverá ser aquecido a 50⁰C e o outro reservatório destinado à tripsina que deverá ser mantida a 25⁰C, sendo necessário para isso que as tampas dos

reservatórios sejam dotadas de 2 monitores, além do duto transportador. Em cada tampa de reservatório deverá haver um termosensor para o monitoramento permanente da temperatura e o outro monitor deverá ser um sensor de nível. Pode-se notar pela Fig. 28 que a ponta do sensor de nível está acima da ponta do duto transportador para evitar a entrada de ar no sistema. O sensor de nível deverá mandar um sinal para que seja paralisado todo o sistema no caso de não haver mais reagente nos reservatórios ou, no caso dos termosensores, as temperaturas estarem fora da faixa programada para o projeto.

5.2.3.2 - MINI-INCUBADORAS

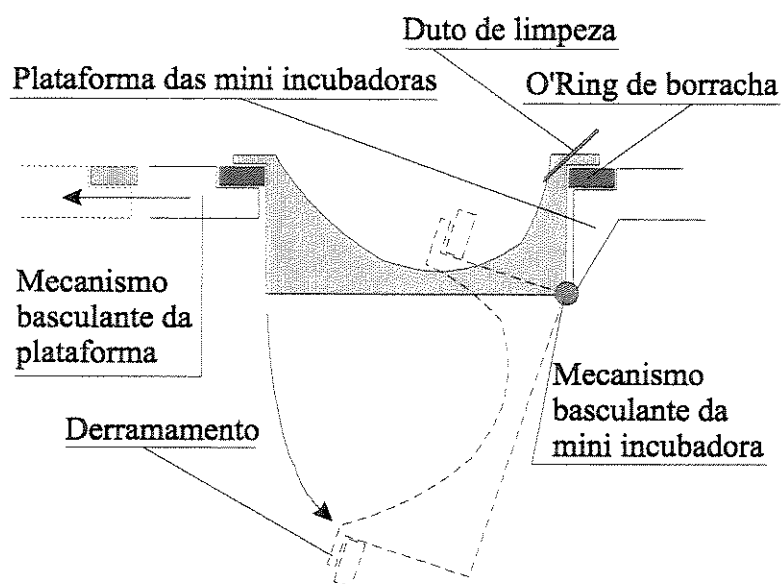


Figura 29 - Mecanismo principal de uma mini-incubadora

As mini-incubadoras são peças primordiais na análise, pois serão elas as responsáveis pelo tratamento enzimático e qualquer deficiência de funcionamento neste procedimento compromete toda a análise (n.º 11/Fig. 25). No projeto deverão constar as seguintes características de construção:

- O interior dessas mini-incubadoras deverá ser isento de cantos vivos para facilitar tanto a saída da amostra de seu interior como a rotina de limpeza depois de cada análise.
- As mini-incubadoras deverão estar assentadas sobre um *o'ring* de borracha nitrílica com espessura suficiente para dar mobilidade aos pequenos movimentos vibratórios que ela deverá executar para uma boa homogeneização durante o tratamento enzimático.
- A temperatura deverá ser rigorosamente controlada em $50^{\circ}C^{+1}$ durante todo o tempo de operação da máquina.
- A construção deverá ser em aço inox ou qualquer outro material que seja bom condutor de calor e que não sofra ataque químico dos reagentes.
- A capacidade deverá ser de 25ml.

As mini-incubadoras aquecidas deverão receber a amostra de leite, o triton-X100 - 0.5% e a tripsina por meio do acoplamento com o *dosador para tratamento enzimático*. Este acoplamento só deverá ser feito depois que a mini-incubadora tiver recebido a amostra de leite proveniente da *Unidade de preparo e coleta*. Esse dosador acoplado é que será o responsável pela dosagem programada dos reagentes acima citados e, concluída a dosagem, o dosador se desacopla e fica aguardando a próxima mini-incubadora, para executar o mesmo procedimento.

Por fim, após os 10 minutos de incubação, a amostra tratada será introduzida na torre de filtração por um vagaroso derramamento executado pelo mecanismo em que a mini-incubadora está montado, como mostram as Figuras 29 e 30, e ainda na posição final de

derramamento, após a transferência da amostra, este compartimento deverá também sofrer um rígido processo de limpeza por detergente aquecido, mais água aquecida e ar quente.

5.2.3.3 - PLATAFORMA DAS MINI-INCUBADORAS

A Fig. 28 detalha o movimento que a mini incubadora deverá fazer no processo de derramamento da amostra para a torre de filtração e a Fig. 29 apresenta a plataforma com as 10 mini incubadoras mostrando a parte do mecanismo de derramamento da plataforma com o mecanismo aberto para o derramamento e outro mecanismo fechado para o tratamento enzimático.

Este componente será uma plataforma circular de aproximadamente 400 mm de diâmetro em alumínio anodizado com 10 mini-incubadoras distribuídas de forma circular com

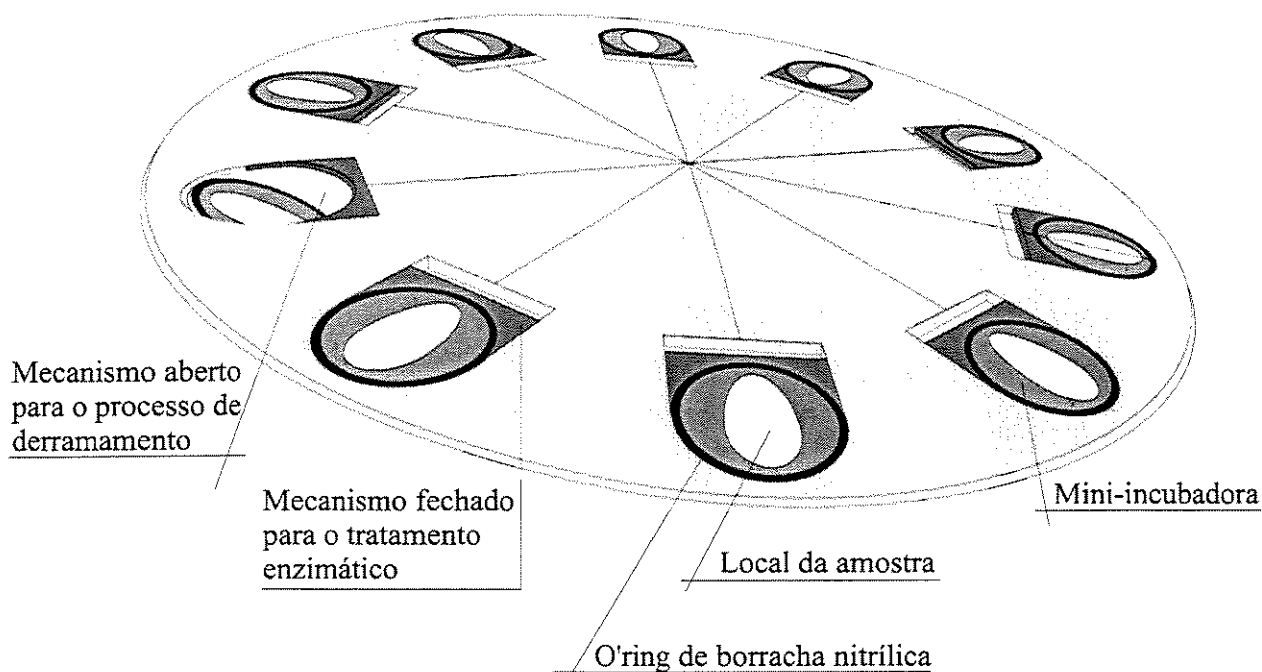


Figura 30 - Plataforma das mini-incubadoras

intervalos de 36° entre as mesmas, sendo o giro da plataforma controlado por um motor de passo com opção de deslocamento de 36 em 36° e de 18 em 18° . O deslocamento de 36° é para que a plataforma posicione a mini-incubadora sempre sobre o coletor para o procedimento de translação da amostra e o deslocamento de 18° é para o procedimento de limpeza entre as análises. A posição normal da plataforma é com uma mini-incubadora posicionada sob o coletor pronto para o recebimento da amostra e ao recebê-la a plataforma gira exatos 36° no sentido horário para que essa incubadora saia do coletor e fique posicionada a espera do acoplamento com o *dosador para tratamento enzimático*.

Ao mesmo tempo em que a mini incubadora recebeu os reagentes do dosador, a outra incubadora posicionada no coletor também já recebeu outra amostra, sendo este procedimento repetido até que as 10 mini incubadoras sejam ocupadas.

Assim que a mini incubadora, já com a amostra, recebe as dosagens de reagentes, inicia-se a contagem de tempo do tratamento enzimático que deverá durar 10 minutos e de 2 em 2 minutos uma forte vibração na mini incubadora para homogeneização e eficiência do tratamento. Haverá no entanto, uma diferença na contagem de tempo em cada uma das mini incubadoras mas ao final dos 10 minutos a mini incubadora em questão deverá estar posicionada exatamente sobre uma das torres da plataforma de torres para que seja executado o procedimento de transferência por derramamento da mini incubadora para a torre de filtração.

5.2.4 - UNIDADE DE FILTRAÇÃO E COLORAÇÃO

5.2.4.1 - DOSADOR PARA COLORAÇÃO

Mecanicamente similar ao dosador para tratamento enzimático, mas com forma e funções diferenciadas, esse dosador será dotado de 4 CPFs (Controlador Pneumático de Fluxo). O dosador entrará em atividade logo depois que a filtração da amostra já tiver sido concluída na torre.

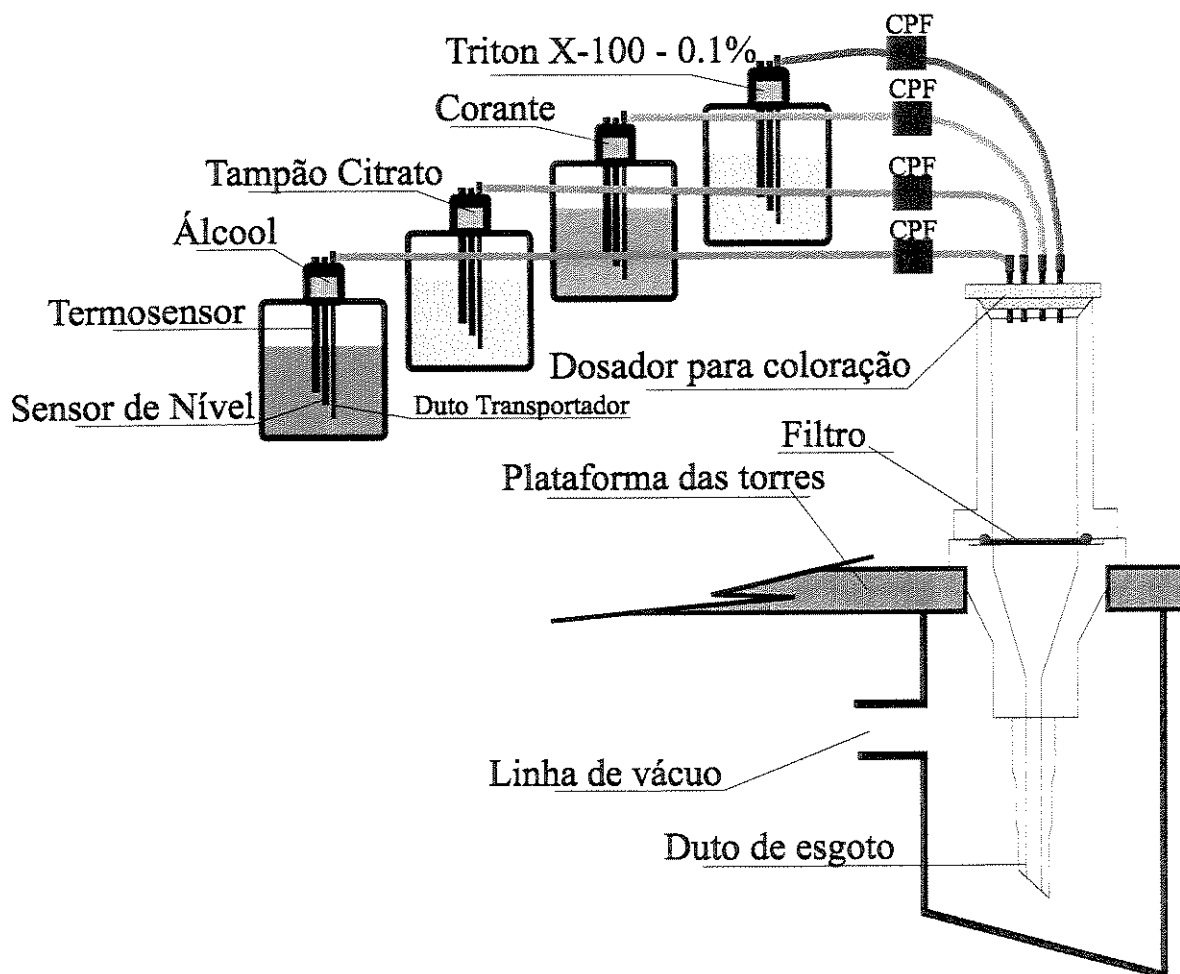


Figura 31 - Dosador de coloração e seu acoplamento com a torre

Os CPFs farão as seguintes dosagens:

- 5.0 ml de triton X-100 0.1%
- 2.0 ml de corante Acridine Orange
- 2.5 ml de tampão Citrato pH 3.0
- 2.0 ml de álcool Isopropílico

O dosador para coloração fará um acoplamento também através de pistão pneumático. Com a torre de filtração e por meio dos CPFs, dosará os reagentes descritos em 5.2.4.1. O primeiro reagente a ser colocado na torre é o acridine orange que deverá permanecer sobre o filtro durante 2 minutos com a linha de vácuo desligada para que o corante possa se fixar aos microorganismos. Após os 2 minutos aciona-se a linha de vácuo e o dosador deverá colocar sobre o filtro 2.5 ml de uma solução de tampão citrato Ph 3.0 e em seguida 2.0 ml de álcool isopropílico.

5.2.4.2 - PLATAFORMA DAS TORRES

Esta plataforma (11 - Fig. 25), deverá também ser similar à plataforma de mini-incubadoras, só que com torres de filtração, sendo os pontos de similaridade os seguintes:

- Controle de deslocamento feito, por exemplo, com motor de passo;
- Separação das torres em 360°C;
- Diâmetro externo;
- Material em alumínio anodizado.

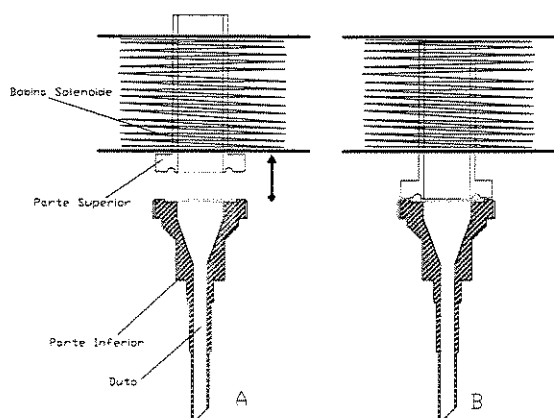


Figura 32 - Torre para filtração

Esta plataforma trabalhará com uma parte sempre sob a plataforma de mini-incubadoras (Fig. 25), e no momento das análises as duas plataformas deverão trabalhar em sincronismo posicionando as torres embaixo das mini-incubadoras.

Dotada de 10 conjuntos de torres com seus encaixes controlados por bobinas solenóides, cada torre é dividida em duas partes aqui denominadas como parte superior e parte inferior, como indicado na Fig. 32. A parte inferior da torre ficará fixa à plataforma circular e nessa parte inferior, por meio de sucção e um transdutor de posição, será colocado o filtro de policarbonato para só depois a parte superior ser encaixada por meio de bobinas solenóides.

A parte superior fará um pequeno movimento de descida para se acoplar à parte inferior (Fig. 32), e estando as partes acopladas, há a necessidade do aquecimento do filtro de policarbonato que poderá ser feito por ar quente ou pela colocação de 5ml de triton X-100 0.1% a 50°C, acionado-se em seguida a linha de vácuo de 100 kPa ligada ao duto de esgoto da torre (Fig. 32), e após a filtragem deste reagente a amostra pode então ser colocada no interior da torre por derramamento, como já citado anteriormente, por meio das mini-incubadoras. Este movimento da

parte superior da torre será executado por uma bobina solenóide circular a qual terá como núcleo a própria parte superior da torre. Ainda com a linha de vácuo ligada, e finalizada a filtração da amostra, mais 5 ml do mesmo triton X-100 0.1% é colocado sobre o filtro para o enxágüe e ao final da filtração, a linha de vácuo é desligada e inicia-se o processo de coloração, feito por um processo semelhante ao dosador para tratamento enzimático.

Porém, ao final deste procedimento, poderá eventualmente haver uma falha que se caracteriza pela não filtração, dentro do tempo programado, de toda amostra do interior da torre, devido a uma forte carga bacteriana, sem o que não será possível dar continuidade ao procedimento. Caso ocorra este tipo de falha deverá haver um dispositivo que se encarregue de abortar somente a análise em questão do sistema, para que esta seja refeita de forma automática, fazendo com que a Unidade de preparo e coleta movimente a esteira para traz e vá buscar exatamente aquela amostra problemática que deverá ser diluída, ou simplesmente a análise deverá ser repetida.

A parte inferior da torre é constituída de um duto que chamou-se de duto de esgoto, para saída de parte indesejadas do leite (Fig. 32), mas que também é utilizado para saída de ar para provocar o vácuo no sistema onde cada torre deverá estar ligada individualmente a uma linha de vácuo de aproximadamente 760 mmHg., onde serão utilizados 100 kPa (aproximadamente 750 mmHg.), para o processo de filtragem nas análises.

5.2.5 - UNIDADE DE PREPARO PARA VISUALIZAÇÃO

Em todos os sistemas automatizados de contagem de bactérias em leite pesquisados, este é sem dúvida o ponto em que os projetistas encontram a maior dificuldade para solução. Como foi afirmado no início do trabalho este é um ponto em que pode se apontar falhas.

Nos dois sistemas apresentados no trabalho, um apresenta o sistema de preparo e visualização questionável tanto na identificação do microrganismo quanto no próprio sistema de contagem e o outro simplesmente descarta o processo de automatização neste setor.

No sistema Bactoscan visto em (2.3.1) uma seringa aplica uma fina camada da amostra na borda de um disco giratório (Fig. 9), que passa na frente de uma objetiva do microscópio. O sistema Cobra, como pode ser visto na Fig. 11 exibe dois módulos, sendo um

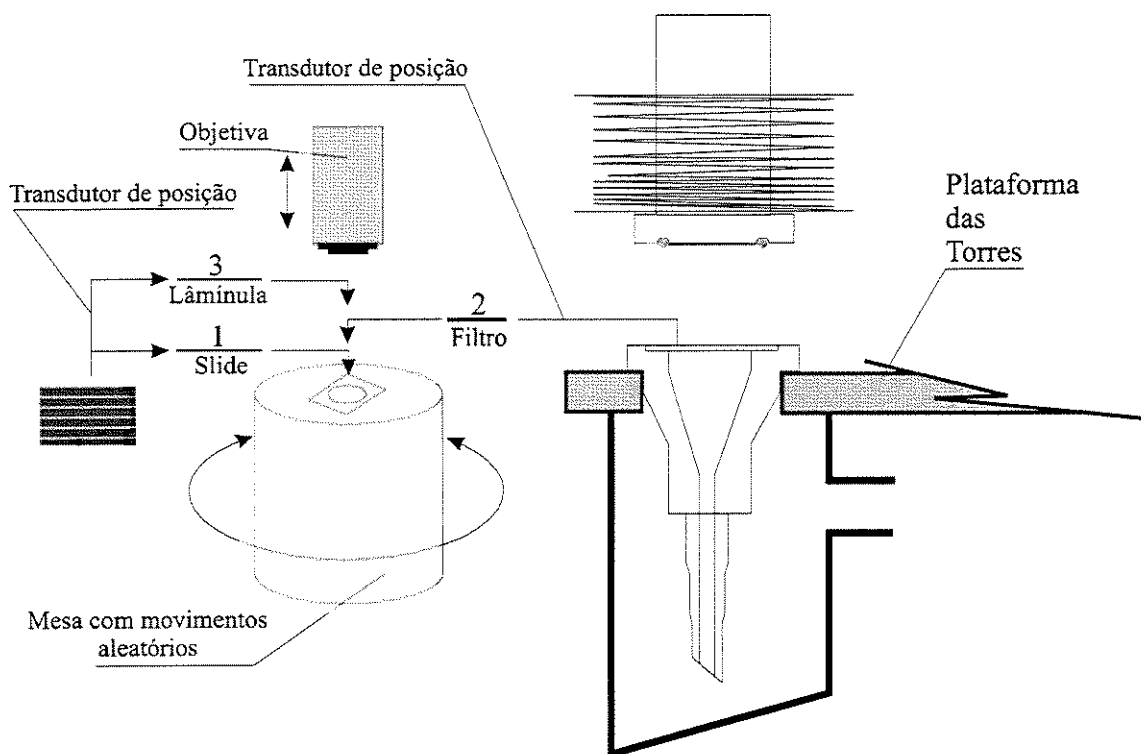


Figura 33 - Mecanismo de preparo para visualização

para o processamento total da amostra e o outro composto de um microscópio de epifluorescência tradicional, onde a amostra é retirada do módulo de processamento e levado manualmente à mesa do microscópio, para o restante do processo de contagem.

O sistema proposto compõe-se de uma mesa de movimentos aleatórios, dois transdutores de posição e um microscópio de epifluorescência. Assim que o sistema finaliza o processo de filtração e coloração a torre se abre, por meio do acionamento de uma solenóide, e o transdutor de posição se encarrega de apanhar o filtro, por meio de sucção e transladá-lo para mesa de movimentos aleatórios (Fig. 33). O outro transdutor de posição se encarrega de posicionar o slide e depois cobri-lo com uma lamínula.

5.2.5.1 - MICROSCÓPIO DE EPIFLUORESCENCIA

Trata-se em princípio de um microscópio comum, basicamente com as mesmas características descritas no Capítulo 2 (2.2.1), configurado somente para epifluorescência, e também com uma câmera CCD digital colorida. Citamos como configuração ideal os seguintes itens:

- Câmera digital colorida equipada com CCD de 1/2" 768(h) x 494(v) pixels
- Ocular da Câmera digital com 12.5 x
- Objetiva do microscópio de 100 x com imersão em óleo
- Fonte de luz com lâmpada de "xenônio" - 100 Watts.

Esse microscópio deverá sofrer algumas mudanças em sua mesa, onde estaria o filtro devidamente montado em uma lâmina para se adaptar ao projeto, pois no lugar da mesa estará a mesa de movimentos aleatórios (Fig. 33) que, através de seu mecanismo, colocará o

filtro em uma posição ideal para a captura das imagens no microscópio por meio da câmera de vídeo colorida CCD.

5.2.6 - UNIDADE DE CONTAGEM POR TRATAMENTO DE IMAGEM

Será necessária a utilização de uma placa de aquisição que faça a captura de imagens coloridas, conectada a uma câmera CCD colorida que, por sua vez, estará conectada ao microscópio de epifluorescência. No caso da placa utilizada neste trabalho, a conexão poderia ser feita por cabos com conectores BNC ou por conectores DB 25. A configuração de um computador para um desempenho razoável seria:

- Um Pentium 100 ou melhor;
- Windows 95 ou melhor;
- Software para o funcionamento - "NI IMAQ";
- Placa de aquisição de imagens.

A proposta é utilizar a placa de aquisição de imagens da National Instruments - Mod. PCI 1408, juntamente com o software NI-Imaq para a captura das imagens. Esta placa permite a captura de imagens coloridas estáticas, o que será necessário para a distinção entre células viáveis ou não.

5.2.6.1 - PLACA DE AQUISIÇÃO DE IMAGENS

A PCI-IMAQ-1408 é um lançamento recente da National Instruments, de fácil instalação, bastando para isto ter um barramento PCI disponível no computador. Essa placa possui 3 chaves (1), (4) e (9) (Fig. 34) em seu lay out para a configuração de acordo com o tipo

de conexão utilizada. Os formatos suportados são RS-170/NTSC em 60 Hz 60 campos por segundo, CCIR/PAL em 50 Hz. 50 campos por segundo ambos no modo entrelaçado, além de uma opção em varredura variável programável.

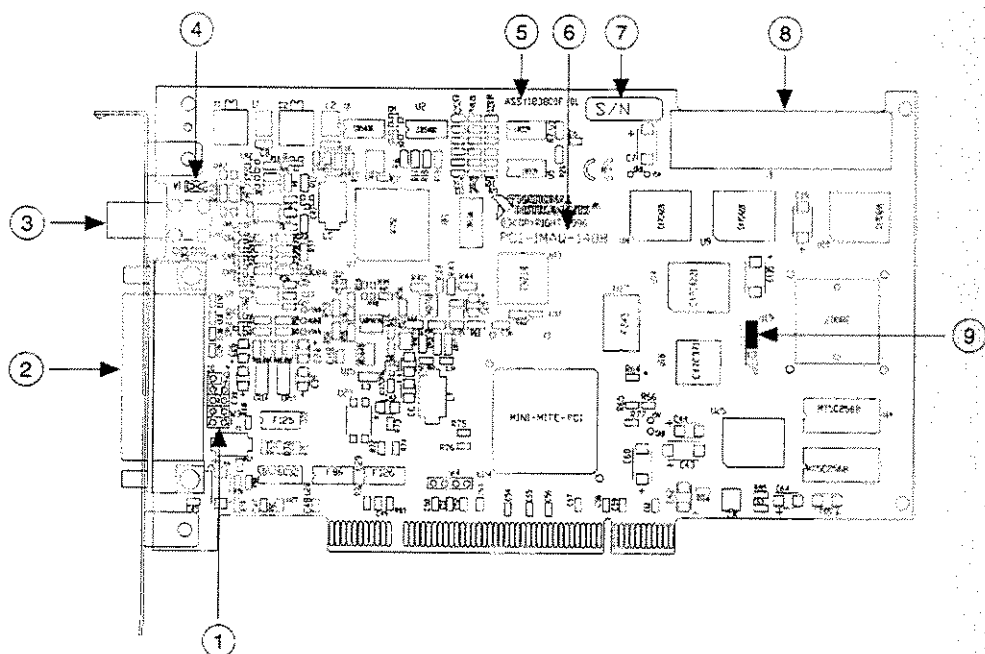


Figura 34 - PCI-IMAQ-1408

Trata-se de uma placa de custo médio com um conversor A/D do tipo *flash* de 8 bits a qual o usuário deverá ter acesso aos seguintes itens:

- 1) - São *jumpers* através dos quais se pode controlar o sincronismo do modo de entrada e um *clock* externo
- 2) - É um conector DB-25 *I/O* através do qual a placa recebe ou emite os sinais de sincronismo horizontal, vertical e de clock.
- 3) - Entrada para conector BNC somente para o modo (*RSE - referenced single-ended*)
- 4) - *Jumper* onde se opta pela entrada em terminal único BNC ou Diferencial DB-25.

- 5) - Número de montagem
- 6) - Nome do produto
- 7) - Número de série
- 8) - RTSI - barramento para comunicação com outros instrumentos da *National Instruments*.
- 9) - Chave de endereço lógico (S1).

5.2.6.2 - SOFTWARE PARA TRATAMENTO DE IMAGEM

O *IMAQ-Vision* é o software que, juntamente com o *Lab-View*, (ambos também da *National Instruments*) permitirá que se faça o tratamento de imagem de bactérias deste trabalho. Este *software* possui ferramentas de trabalho virtuais (*VI*s. - *Virtual Instruments*), e possui uma linguagem totalmente orientada a fluxo de dados para todo o procedimento de programação no tratamento, o que facilita o trabalho, pois são deixadas de lado as cansativas linhas de comando escritas como na maioria dos softwares destinados a este fim.

O *IMAQ-Vision* possui aproximadamente 400 *VI*s, e neste trabalho daremos mais ênfase ao estudo das *VI*s. responsáveis pela morfologia, que é o que interessa diretamente ao trabalho.

5.2.6.3 - SUGESTÃO DE RECONHECIMENTO E CONTAGEM USANDO O

"IMAQ-Vision"

Embora seja apenas uma proposta de automatização do método, é sugerido aqui um modo de tratamento das imagens obtidas manualmente neste trabalho para a contagem de

microrganismos usando o *IMAQ-Vision* que é a mesma ferramenta que será utilizada para o trabalho final do projeto de automatização.

O trabalho de reconhecimento e contagem foi feito com imagens de bactérias em leite cru com tamanhos entre 1 e 5 microns. As imagens foram feitas em um microscópio confocal, com varredura a *laser*, realizadas na FEA - Faculdade de Engenharia de Alimentos, produzidas com a extensão “TIF” (colorida). O primeiro passo foi reconhecer as “*Vis*” e saber qual a função atribuída a cada uma delas, principalmente as que tratam do processamento e da morfologia. Antes do processo morfológico é necessário gerenciar e estruturar a imagem; assim sendo, a primeira *Vi* que se teve acesso é a **Cvi Create**, mostrada abaixo.

Cvi Create:

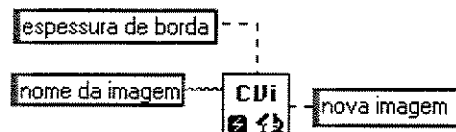


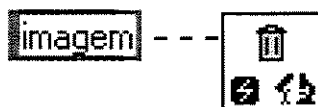
Figura 35 - Cvi Create

Esta “*Vi*” cria, referencia e gerencia uma nova imagem. Os formatos de imagens que esta *Vi* comporta são cinco mas o trabalho se limitou sempre a três opções:

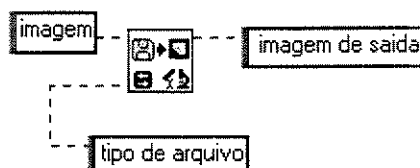
0 = Binária - 8 bits

1 = Tons de cinza - 16 bits

4 = RGB - 32 bits

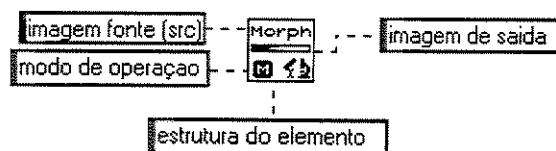
Cvi Dispose:**Figura 36 - Cvi Dispose**

Em conjunto com a Cvi Create, a *National Instruments* recomenda o uso da Cvi Dispose para evitar uma provável saturação de memória reservada para o *LabVIEW* no computador, e no caso de imagens em tempo real o uso dessa “Vi” é imprescindível.

Cvi ReadFile:**Figura 37 - Cvi ReadFile**

Para leitura de qualquer arquivo de imagem, a “VI” responsável é a Cvi ReadFile. Apesar de o NI-Imaq criar apenas arquivos com a extensão BMP, a Cvi ReadFile admite entrada de arquivos com extensão APD, TIF e BMP, possibilitando com isso a entrada de arquivos externos para tratamento via *IMAQ-Vision e LabView*.

Com a Cvi ReadFile, define-se como visualizar a imagem a ser gerenciada pela Cvi Create, se esta será em tons de cinza ou em cores. Como por hora o trabalho será realizado com as propriedades morfológicas das bactérias, optou-se então pelas imagens em tons cinza e binárias. Mas convém lembrar que o tratamento com imagens coloridas também fará parte do trabalho para a distinção de células viáveis e células mortas.

Cvi GrayMorphology:**Figura 38 - Cvi GrayMorphology**

A Cvi Gray Morphology foi utilizada para fazer a filtragem da imagem para eliminar parte da sujeira que aparece na imagem que pode ser confundida com as imagens a serem analisadas. Esta filtragem é feita por meio dos tons de cinza.

Nesta fase o importante é a escolha correta do elemento estruturante. Foi adotada a conectividade 4 (retangular) pôr este se tratar de um problema de tratamento de imagem para o qual não é exigido maiores precisões.

Cvi Segmentation:**Figura 39 - Cvi.segmentation**

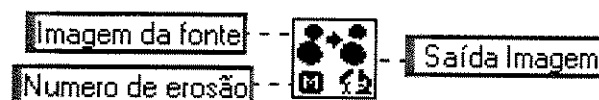
Os tipos de células que serão monitoradas podem apresentar-se, em determinados casos, sobrepostas e vir a ser consideradas, para efeito de contagem, como uma unidade após o tratamento. Para evitar este transtorno, a Cvi segmentation faz com que as mesmas não sejam consideradas como uma só por meio de cálculo da área estabelecida aos microrganismos de acordo com seu tamanho.

Cvi BuildKernel:**Figura 40 - Cvi BuildKernel**

A Cvi BuildKernel foi utilizada para determinar os elementos de estruturação da imagem (pixel), que se apresentam em forma de matriz 3x3, a ser utilizado no processamento da imagem.

Cvi Thereshold:**Figura 41 - Cvi Threshold**

Como as imagens adquiridas não apresentavam um padrão de uniformidade na sua aquisição, após a filtragem e segmentação exige-se do operador ajuste manual para obter a imagem ideal para o tratamento e contagem das células. Por isso deve-se utilizar a *Vi Threshold*, através da qual determina-se o alcance em que o tratamento de imagem melhor se enquadra. Como as imagens de tons cinza apresentam um range de 0 a 255 e, determina-se que o *range* do *threshold* tenha o valor de 50 a 100, então, somente estes tons de cinza é que farão parte do procedimento de tratamento de imagem desta *Vi* em diante.

Cvi Separation:**Figura 42 - Cvi Separation**

A Cvi Separation realizou a separação das partículas que primeiramente foram segmentadas por estarem sobrepostas, para posterior contagem.

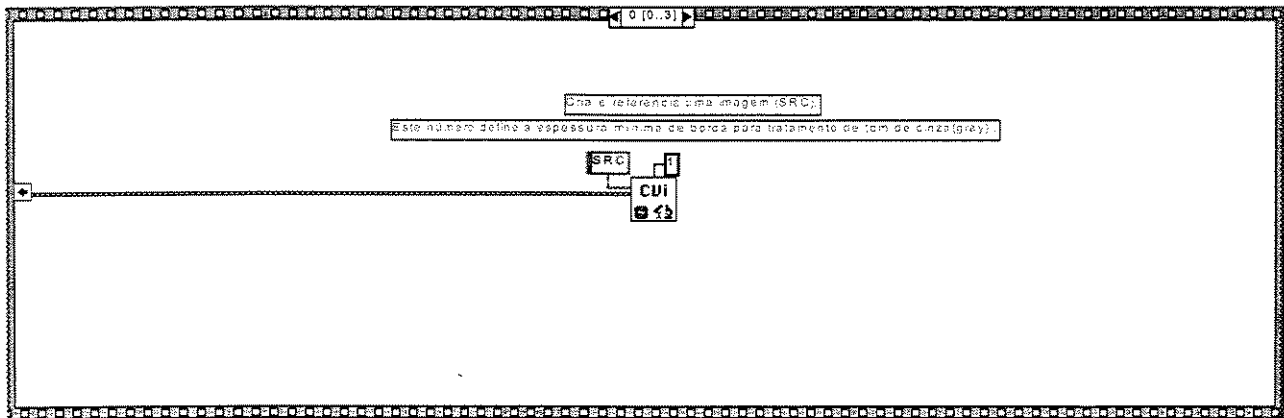
Cvi Label:**Figura 43 - Cvi Label**

Após a análise morfológica foi realizada a análise quantitativa que é a contagem da partículas utilizando a Cvi Label. **Cvi WindDraw:**

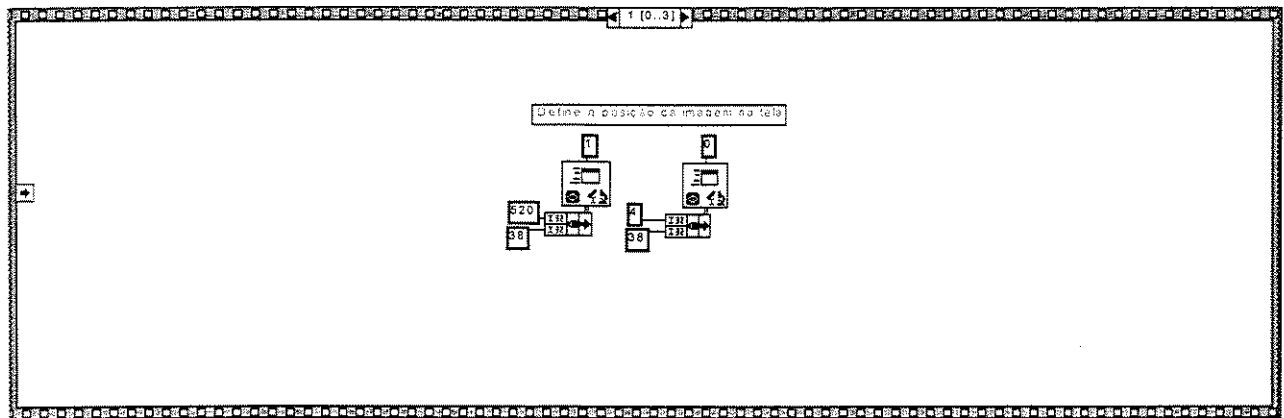
**Figura 44 - Cvi WindDraw**

Esta "Vi" é responsável em exibir na tela a imagem do processamento em qualquer setor da programação, como na Fig. 45 onde essa "VI" foi utilizada no início da aquisição, logo depois da leitura do arquivo e no final (45-C) [19].

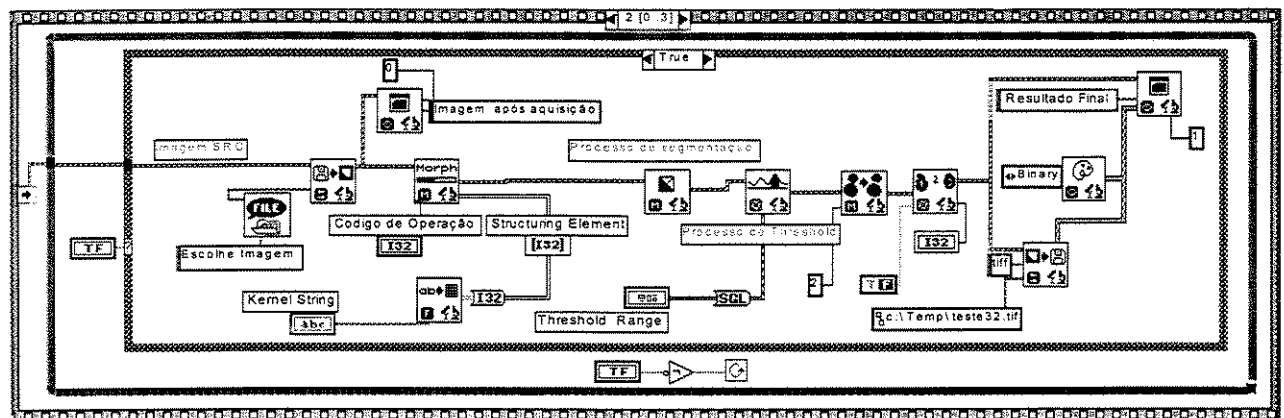
A



B



C



D

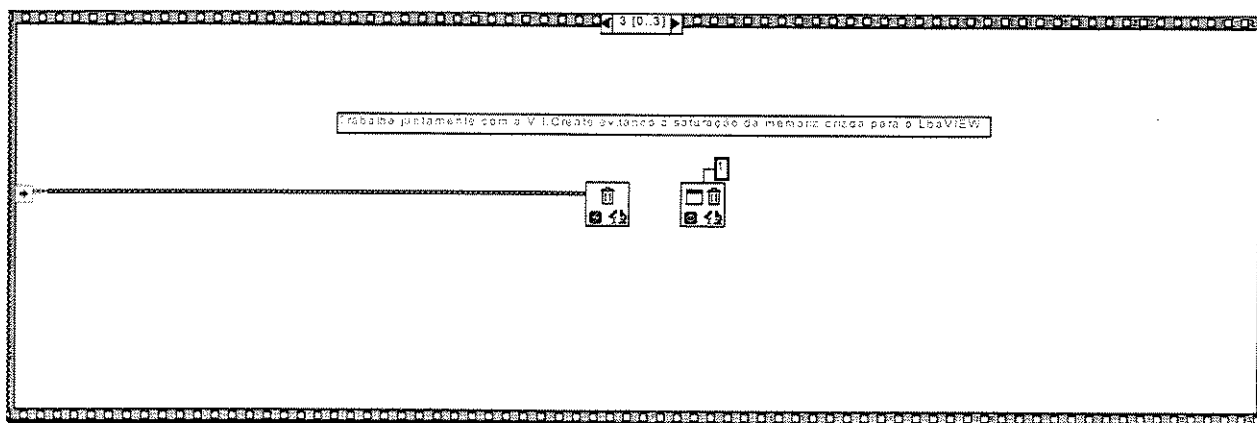


Figura 45 - Forma de programação para tratamento de imagem com o IMAQ-Vision

A Fig. 45 mostra a página principal de um programa de tratamento de imagem no *IMAQ Vision* da *National Instruments* no qual a entrada de imagem é colorida com extensão (TIF), e esta é transformada em imagem em tons de cinza para a contagem.

Este tipo de programação totalmente orientada a fluxo de dados foi executado da seguinte maneira:

Em 45-A referencia-se e especifica-se a espessura de borda da imagem a ser tratada. Adotou-se a espessura "1", que é a mínima que o *software* permite para a borda da imagem e referenciou-se como SRC, (nomenclatura indicativa).

Em 45-B por "default" caso seja utilizada somente uma *Vi - WindMove*, a imagem será automaticamente colocada em (0,0) do plano cartesiano da tela. No caso deste trabalho, foi feito uso de duas *Vis - WindMove*, "[0] e [1] em 50-C" que necessitam de orientação para o posicionamento correto na tela que no caso foi (4,38) e (510,38). O IMAQ-Vision permite que se faça até 15 exposições de imagens na tela durante o processo de tratamento.

Em 45-C apresenta-se a parte da programação que traz a seqüência do tratamento depois do gerenciamento, definição da imagem e definição de espessura de borda da mesma, onde a imagem é lida pela *Vi ReadFile* e em seguida é mostrada na tela, (Fig. 47). Em seguida a imagem é submetida a *Vi Morphology*, onde se cria o elemento estruturante e defini-se a conectividade entre as partículas 4 ou 8, onde a imagem é dividida em 256 tons de cinza.

Na sequência o processo de segmentação e o threshold para a seleção de quais dos 256 tons de cinza é que seguirão no tratamento, a separação, a contagem e apresentação da imagem tratada na tela, Fig. 48.

Em 45-D é feita uma prevenção para que não haja saturação na memória alocada para o *Lab-View*.

Ao final do processo de tratamento, a tela mostra duas imagens do processamento, que podem ser escolhidas ou até mesmo mostrada mais imagens do processamento e um painel ligado à *Vi Label* para indicar o total de bactérias contidas naquele campo de imagem, conforme Fig. 49.

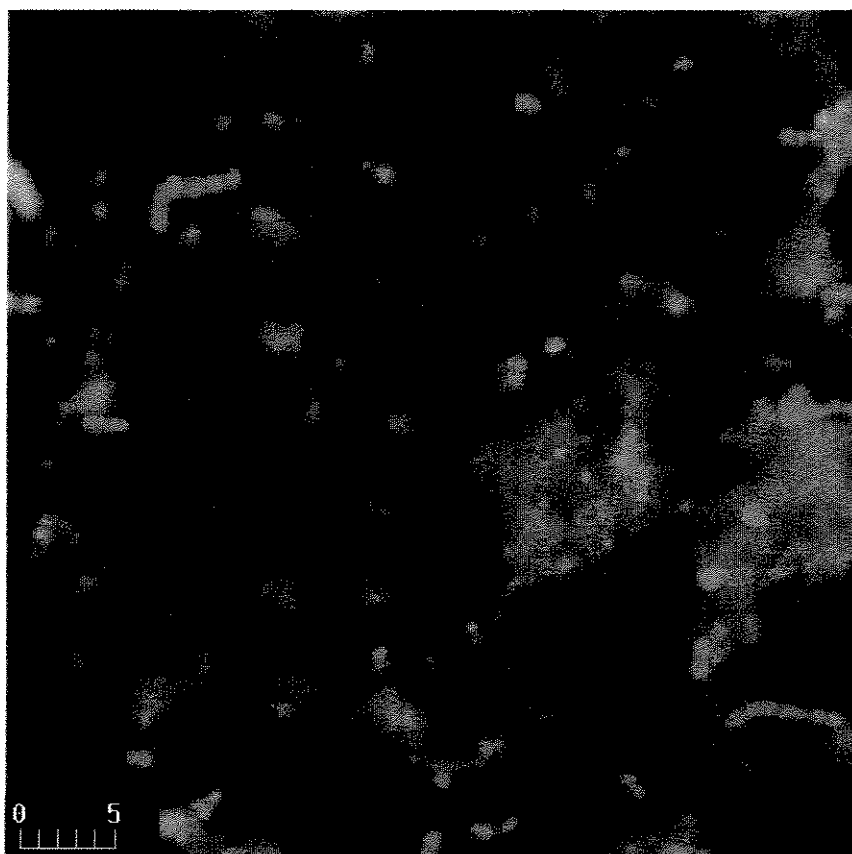


Figura 46 - Imagem de bactérias a serem tratadas e produzidas no microscópio *confocal* da FEA (Faculdade de Engenharia de Alimentos), com extensão (TIF)

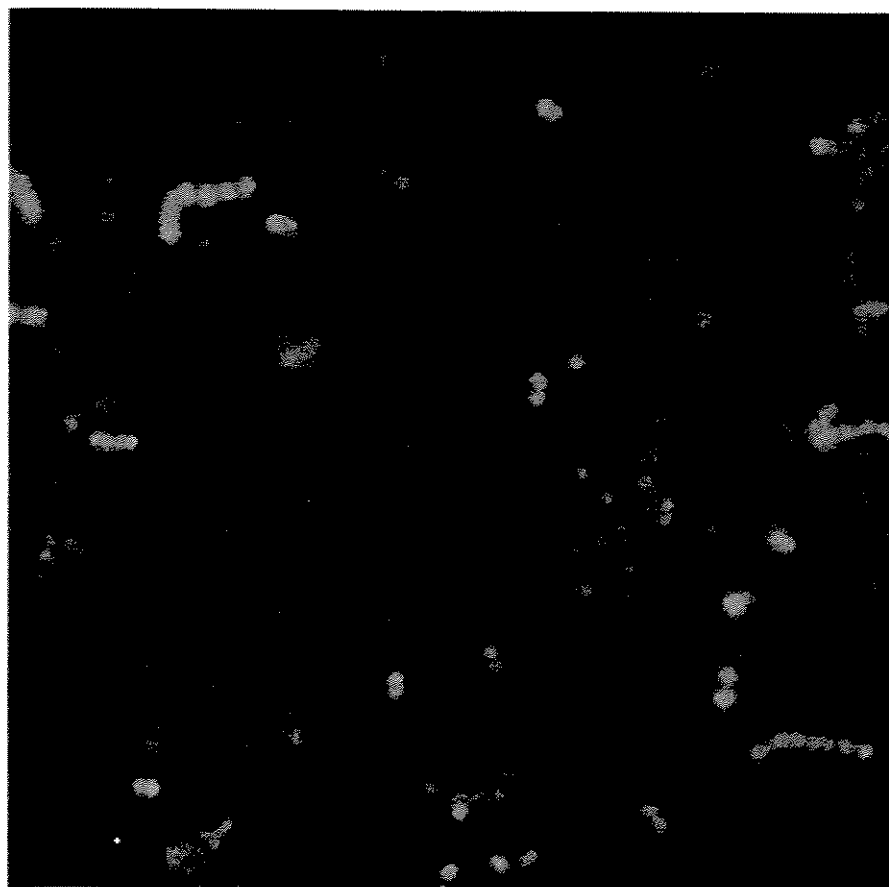


Figura 47 - Imagem submetida à leitura depois de gerenciado pelo programa sugerido pelo trabalho no setor 45-C da Fig. 45 na "*Vi*" *Display* intitulada "Imagem após a aquisição".

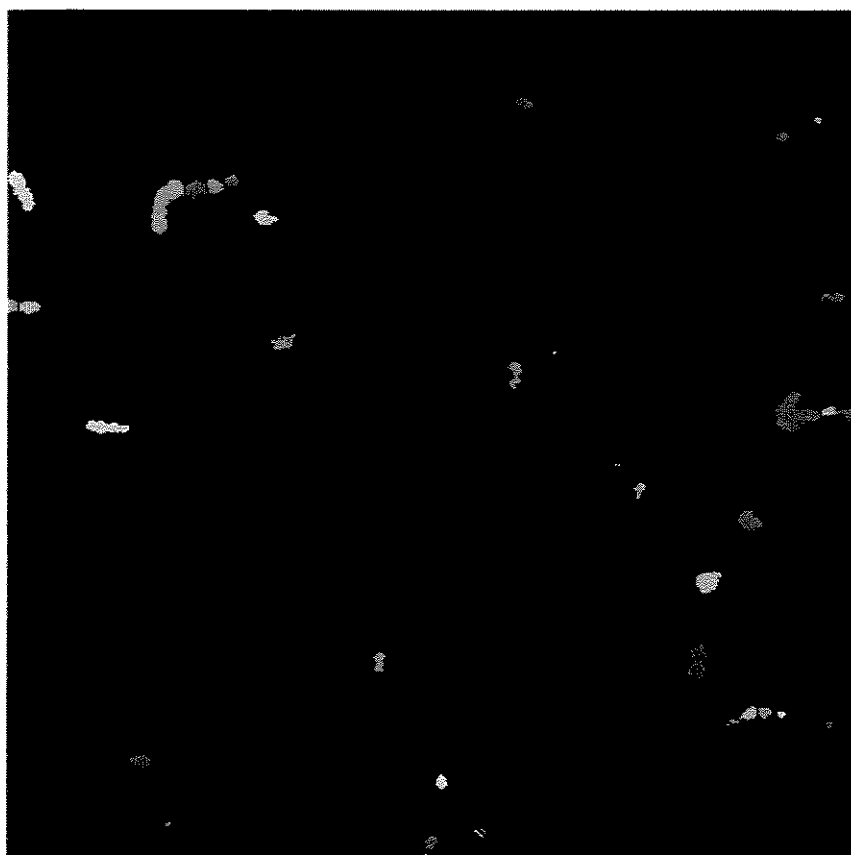


Figura 48 - Imagem tratada e pronta para a contagem no programa na qual pode-se notar claramente os efeitos da segmentação para a separação de agrupamentos de bactérias para a contagem de forma individual. A "Vi" Display responsável por essa amostragem é a intitulada "Resultado Final" na Fig. 45-C.

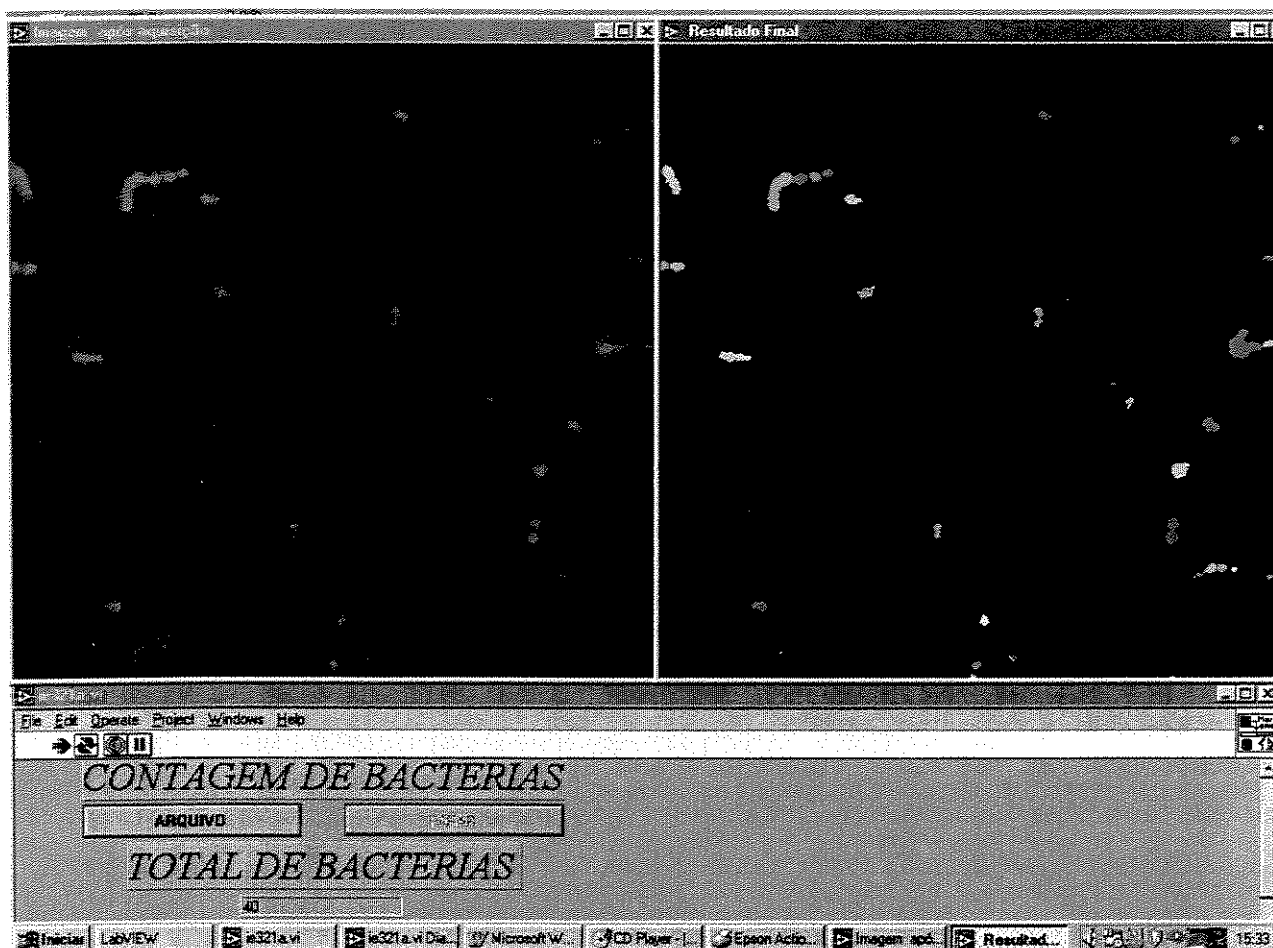


Figura 49 - Tela com uma imagem do setor intermediário do tratamento, a imagem final e a contagem das bactérias nela contida.

5.3 - LÓGICA DE FUNCIONAMENTO

Será necessário um tempo para que o sistema esteja apto a executar a primeira análise, tempo este que não deverá ultrapassar 30 minutos. A *Unidade central de controle* se responsabilizará pelo procedimento de inicialização do sistema, cumprindo a seqüência lógica demonstrada no diagrama de blocos (Fig 50).

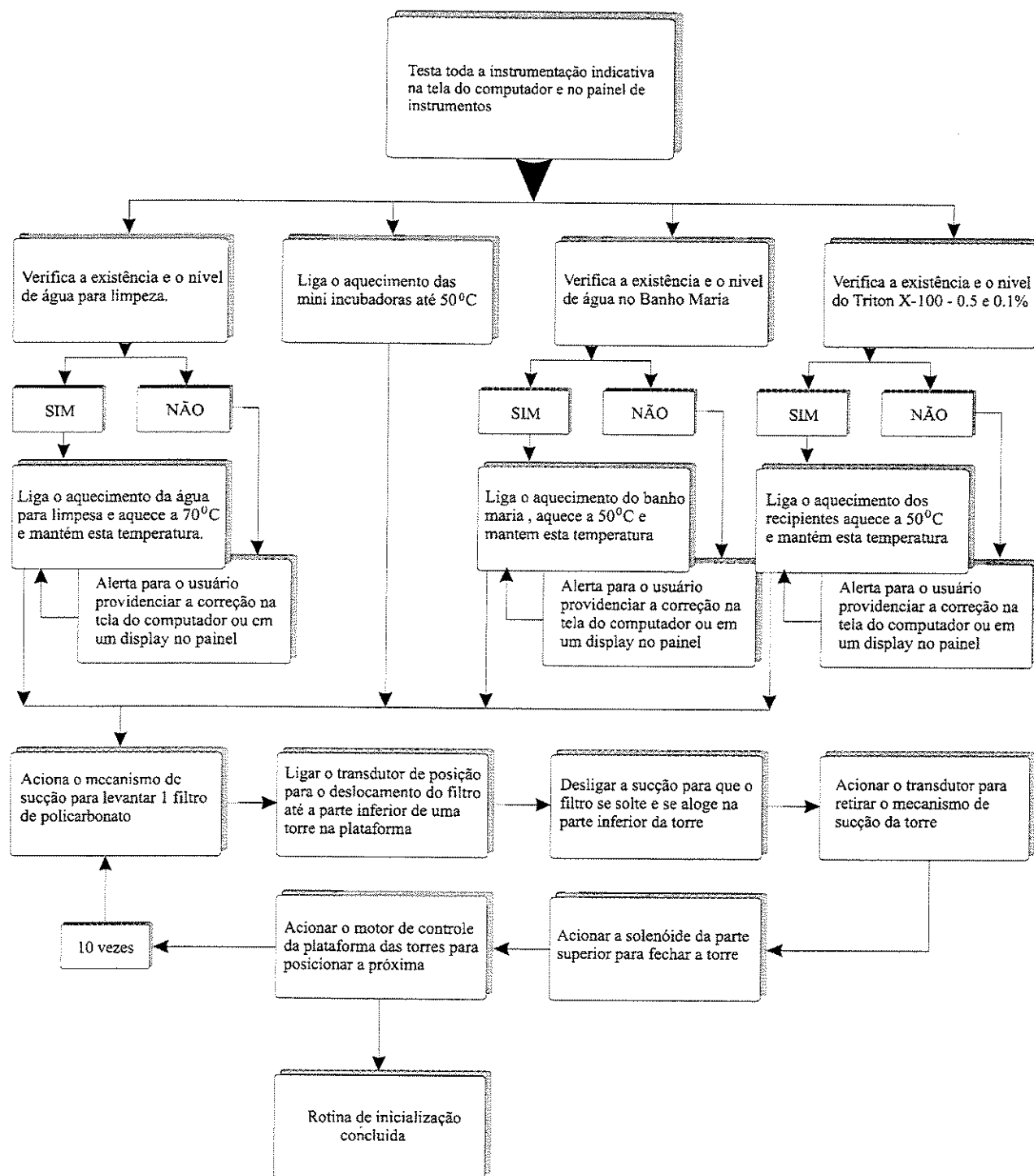


Figura 50 - Diagrama de blocos do procedimento de inicialização

Depois de cumprida a rotina de inicialização o sistema ficará a espera das amostras na esteira móvel. A próxima rotina é a da Unidade de preparo e coleta da amostra que está detalhada no diagrama de blocos da Fig. 51 e descritos abaixo.

- O leite é colocado em recipiente apropriado e é levado ao *suporte do conjunto de amostras*.
- A amostra de leite é pré aquecida a 50°C por 5 minutos.
- O suporte do conjunto das amostras é deslocada por meio de uma esteira até que a primeira amostra se posicione sob o coletor.
- O *coletor* desce à haste até o leite no recipiente do *suporte do conjunto de amostras*, homogeneiza com movimentos vibratórios e suga 2ml, por meio de uma bomba peristáltica.
- O leite é transladado do recipiente para a *mini-incubadora*, que já deverá estar aquecida a 50°C , para receber a amostra.

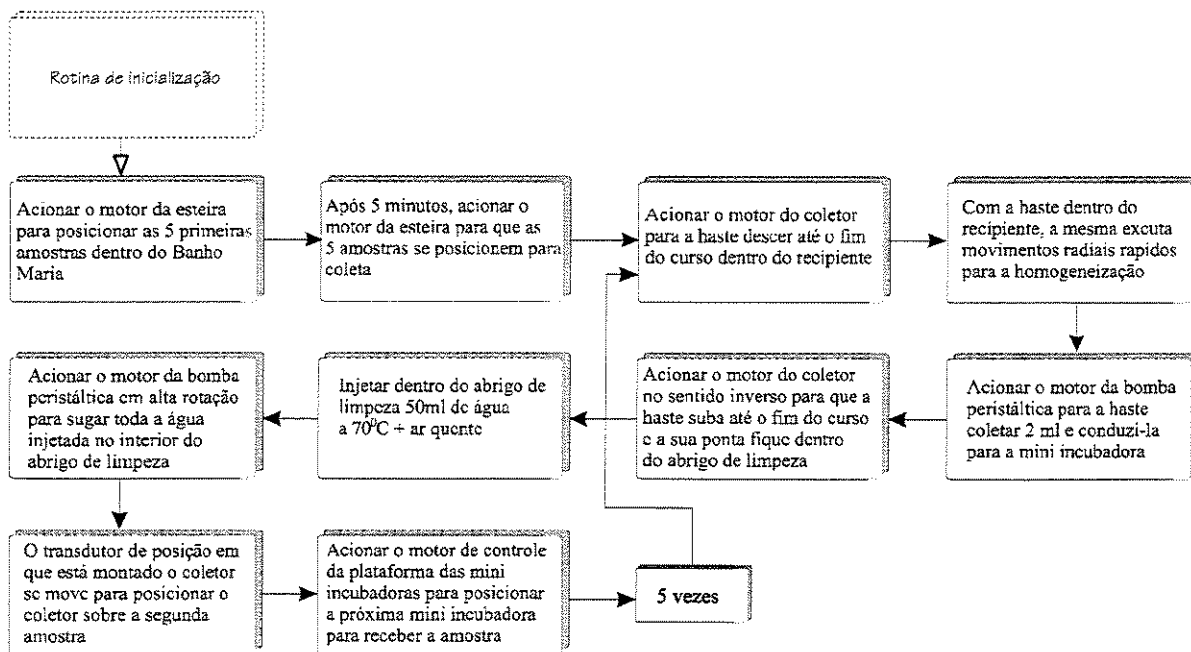


Figura 51 - Diagrama em blocos do funcionamento da *Unidade de preparo e coleta da amostra*

A rotina de coleta das 5 primeiras amostras não deverá exceder a 5 minutos, e caso a coleta tenha terminado antes dos 5 minutos, deverá haver um tempo de espera para que as próximas 5 amostras permaneçam por exatos 5 minutos no banho maria do sistema. Terminado o tempo de permanência das amostras, inicia-se a mesma rotina da Fig. 51 para as 5 restantes.

Concluída a coleta, de imediato inicia-se a dosagem de reagentes para o tratamento enzimático (Fig. 52):

- É acoplado sobre a mini incubadora o dosador para tratamento enzimático. Este *dosador* adicionará, sobre a amostra de leite, 2 ml de Triton X-100 0.5% aquecido a 50⁰C e 0.5 ml de Tripsina "Difco" reidratada e a temperatura de 25⁰C, em seguida se desacopla e aguarda a próxima mini-incubadora.
- A *mini-incubadora* se encarrega de homogeneizar a amostra já preparada por meio de movimentos vibratórios de 2 em 2 minutos para uma boa atuação enzimática.
- O tratamento enzimático dura exatos 10 minutos e a temperatura da mini-incubadora deverá ser mantida constante e monitorada a todo o momento.

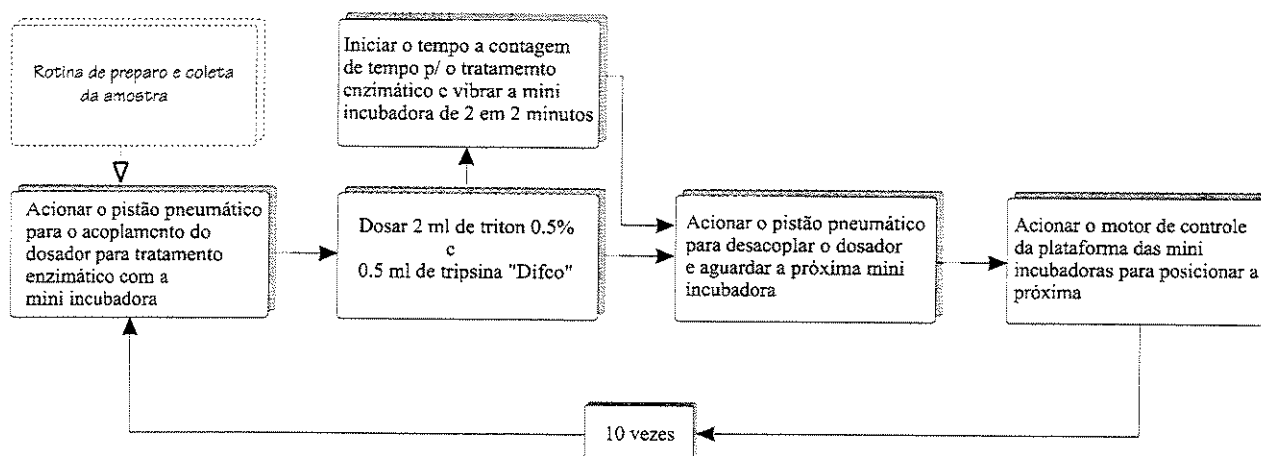


Figura 52 - Diagrama de blocos da *Unidade de incubação* na plataforma das mini incubadoras

O próximo diagrama refere-se ao procedimento de filtração e coloração da amostra.

- A *mini-incubadora* deverá estar posicionada exatamente sobre uma das torres de filtração disponível da *plataforma das torres*.
- Quando uma das contagens de tempo do tratamento enzimático atingir 9 minutos e 55 segundos, 5 ml do Triton X-100 0.1%, aquecido a 50°C, deverá ser despejado por sobre o filtro no interior da torre, com o objetivo de aquecer a torre e otimizar a permeabilidade do filtro de polycarbonato.
- Neste instante aciona-se a linha de vácuo que deverá alcançar 750 mmHg, para uma perfeita filtração.
- Imediatamente após a filtração do triton X-100 para o aquecimento do filtro, a mini-incubadora coloca o leite tratado no interior da torre por derramamento, aguarda-se a filtração e enxágua-se o filtro com mais 5 ml de Triton X-100 - 0.1%.
- Aguarda-se 20 segundos e desliga-se a linha de vácuo.
- O próximo passo é adicionar sobre o filtro o acridine orange e aguardar por 2 minutos para a atuação do corante.
- Acionar a linha de vácuo.
- Enxágua com 5ml Tampão citrato pH 3.0 e em seguida 3ml de álcool isopropílico.
- Desligar a linha de vácuo.

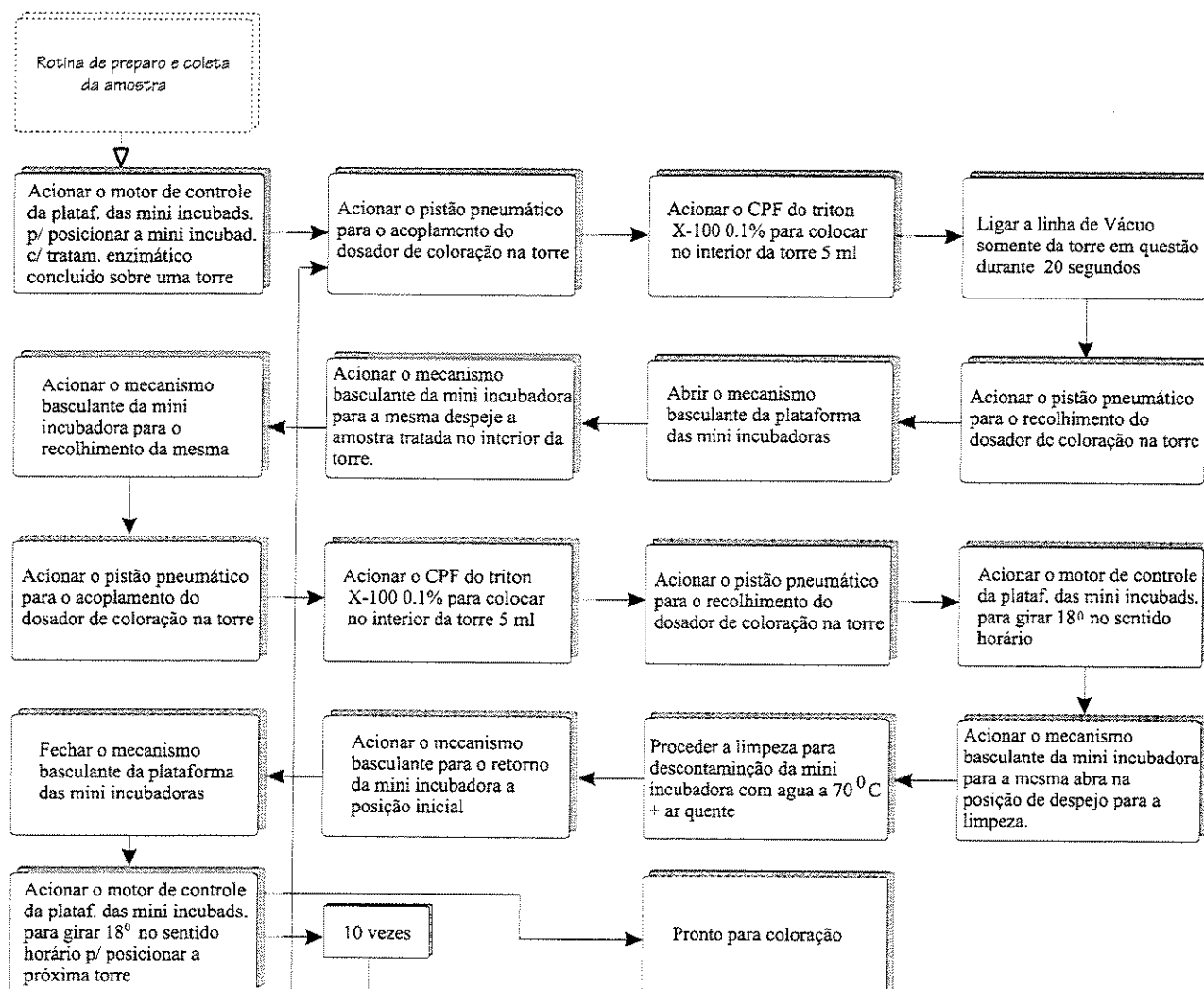


Figura 53 - Diagrama de blocos dos comandos da *Unidade filtração e coloração / filtração*

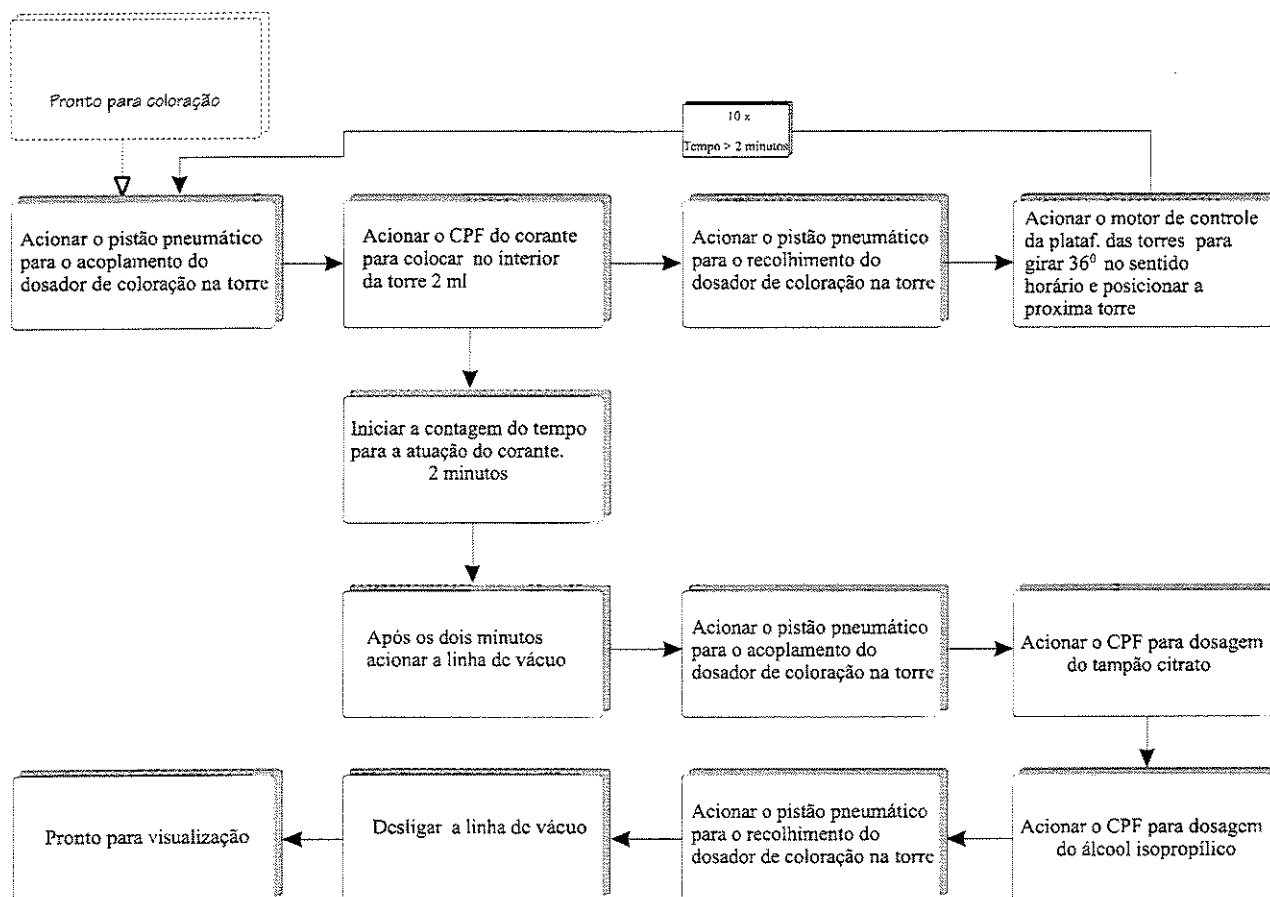


Figura 54 - Diagrama de blocos da Unidade de filtração e coloração / coloração

O preparo para visualização é um problema de difícil solução quando se trata de automatização, como já visto em (5.3.5). O trabalho propõe a seguinte solução:

- A parte superior da torre sobe possibilitando o acesso ao filtro.
- Faz-se a montagem do filtro em lâmina com uma gota do óleo de imersão utilizado nas objetivas do microscópio.
- Focaliza-se e faz-se a aquisição de no mínimo 15 campos de imagens sobre a área afetiva de filtração no filtro de modo aleatório para fazer a contagem.

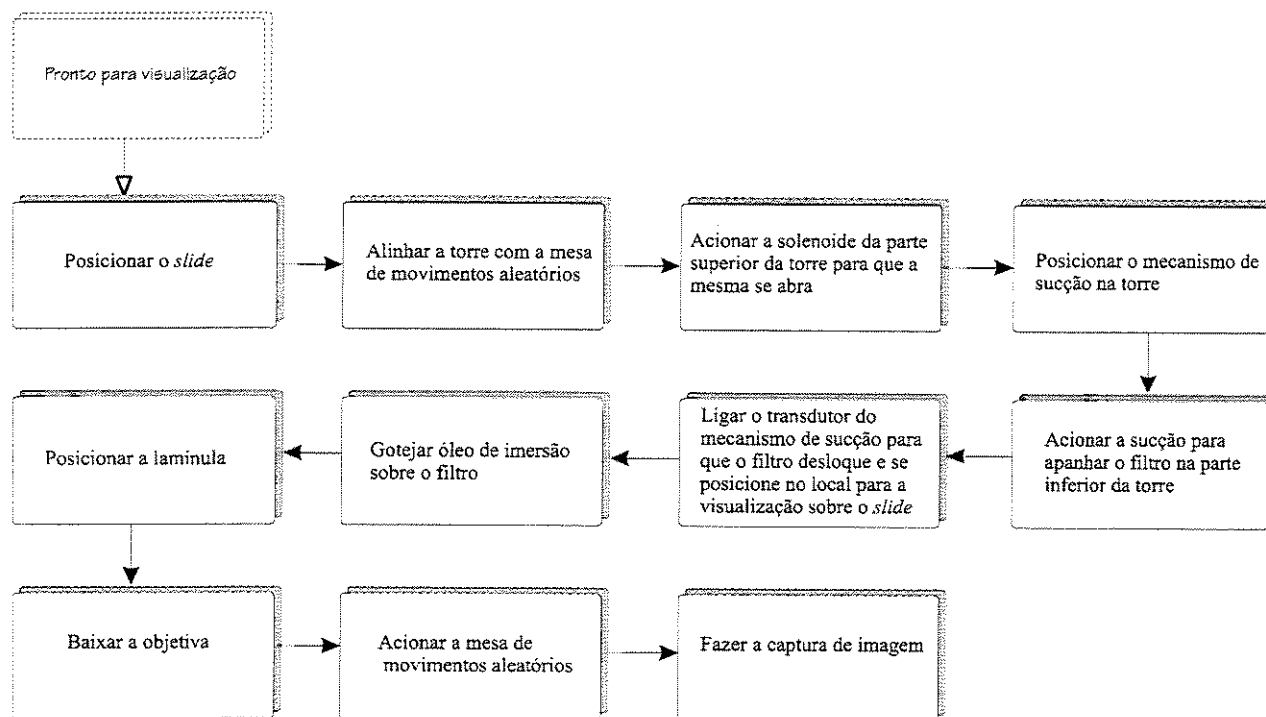


Figura 55 - Diagrama de blocos da Unidade de preparo para visualização

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO

Os objetivos foram plenamente alcançados com relação ao domínio e padronização da técnica "DEFT", com resultados acima do esperado.

A Fig. 23 mostra que o resultado da correlação entre os dois métodos usados no trabalho foi considerado um dos melhores com " $r = 0,88$ ", já que a literatura consultada considera como boas correlações valores entre "0,78 e 0,90". Observando ainda o mesmo gráfico, nota-se também uma tendência a uma correlação ainda melhor se for levado em consideração as amostras de leite com contagens entre 10^5 e 10^6 , o que demonstra um melhor desempenho em contagens altas, como é o caso do leite brasileiro em sua maioria.

As Tabelas 5 e 6 mostram uma contagem ligeiramente maior para o "DEFT", o que é perfeitamente justificável, pois este método submete a amostra a um isolamento de microrganismos, enquanto que a contagem em placas seleciona os mesmos através de seus meios de cultura e da temperatura de incubação. É bem verdade que a maioria dos microrganismos lácticos estão entre os aeróbios mesófilos, que é o teste mais usado para a avaliação microbiológica, mas mesmo assim ficam de fora os psicrotrófilos e os termófilos na contagem em placas.

O fato de a contagem DEFT ser maior que a contagem em placas na maioria das comparações deve ser observado com atenção, pois durante o estudo e as pesquisas sobre a técnica proposta, existiram procedimentos feitos por pesquisadores respeitados na área, passíveis de questionamento. Um exemplo é a procura de uma correlação entre os dois métodos, sendo este um procedimento questionável porque se o meio de cultura utilizado nos experimentos é específico para aeróbios mesófilos, *como se poderá chegar a um resultado de correlação 1 ou próximo de 1 com o DEFT, como mostram alguns trabalhos publicados [18]?*

A conclusão a que se chega é que, apesar dos Ministérios da Agricultura e Saúde terem como método padrão a contagem em placas, o DEFT parece ser uma contagem mais rápida e mais próxima do real número de microrganismos contidos na amostra de leite, pelo fato de além de se notar uma maior contagem no DEFT, o seu processo de seleção permite a visualização de mesófilos, de alguns psicrótrófilos e termófilos na maioria das comparações.

Portanto tratamento enzimático dado às amostras pelo "DEFT" pode destruir 20% da flora microbiana do leite, como afirma Pettipher [7], mas ainda assim esse processo de seleção demonstra ser mais eficiente quando se trata da seleção de microrganismos para a contagem.

Uma das razões do uso do AO (acridine orange), é o fato deste corante ter um setor no espectro para excitação e dois setores para emissão. Em princípio pensava-se que todas as bactérias viáveis fluoresciam na cor laranja e as não viáveis na cor verde. Depois constatou-se que isso só acontecia com parte das bactérias, havendo casos de acontecer exatamente o contrário, como ocorre com o *lactococcus lactis* (Fig. 1) que em sua fase estacionária pode facilmente crescer em contagens em placas como células viáveis e no DEFT, ou qualquer outro processo que se utilize do mesmo corante para este fim neste caso ele manifesta sua fluorescência na cor verde, o que pode causar uma imensa confusão na definição de quem é e quem não é viável.

Os pesquisadores optam por não tocar neste assunto pelo fato de não ser muito freqüente este tipo de comportamento dessa bactéria, já que ela se porta dessa maneira somente em sua fase estacionária. Fora disso, ela fluoresce normalmente como as outras bactérias viáveis quando se utiliza esta metodologia. Mas nada impede de se fazer então a contagem total dos microrganismos, o que pode vir a dar uma diferença gigantesca, quando comparado à contagem

em placas, isto porque em contagem em placas, só se consegue a contagem, sem visualização de formas das bactérias viáveis, que são as chamadas UFCs.

Se for levado em consideração o custo de uma contagem em placas, R\$ 45,00, e o custo que se obteve por análise com o DEFT R\$ 4,00, fica óbvio a viabilidade da proposta, ainda mais se for levada em conta a automatização com 10 amostras para análise, feitas quase simultaneamente nesse caso com certeza se chegará a custos mais baixos. A grande vantagem da proposta é a rapidez unida à automatização que, de acordo com a proposta do trabalho, parece ser possível de se transformar em um produto acabado para comercialização com baixo custo financeiro, se compararmos ao preço de um *Bactoscan* US\$ 200.000 (Duzentos mil dólares). Este valor inclui somente o preço da máquina e não as despesas de instalação.

Um dos principais argumentos desta proposta, e talvez o de maior impacto na avaliação da qualidade do leite, é que com ela este tipo de análise poderá facilmente passar de análise de controle para análise de seleção devido à rapidez do processo.

A crença na possibilidade desta proposta vir a se transformar em um produto de comercialização é muito grande devido à experiência tanto no meio acadêmico quanto na iniciativa privada dos membros das duas faculdades envolvidas no projeto e também dos custos de desenvolvimento que devem atingir aproximadamente a metade do custo de um *Bactoscan*.

Essa parceria foi benéfica tanto na questão do custo quanto na questão da viabilidade. Para que se tenha uma idéia, um sistema de torre para filtração da marca *Millipore* [20], utilizado quase que na totalidade dos experimentos descritos em revistas internacionais para os mesmos propósitos, teve seu preço cotado em 30/06/98, a R\$ 1.353,00 (Um mil, trezentos e cinquenta e três reais) ao passo que se tirarmos o custo de desenvolvimento, já que o projeto foi desenvolvido dentro dos departamentos de Microeletrônica e Ciência de Alimentos, o custo de

fabricação da torre de filtração utilizada no trabalho foi de R\$ 300,00 (trezentos reais), de forma terceirizada, ou seja, em números absolutos houve uma economia de custos por volta dos 77%.

Está bem claro que o objetivo é atingir os interesses da indústria laticinista do Brasil, mas convém lembrar que contagens de microrganismos se faz também em áreas como a médica e a farmacêutica, o que significa que existe um campo muito grande para a exploração com o aproveitamento desta técnica. Mas é preciso ter noção da distância que existe entre um projeto acadêmico e um produto para a comercialização, e a experiência tanto no meio acadêmico quanto na iniciativa privada dos professores e pesquisadores envolvidos neste projeto visa exatamente diminuir ao máximo esta distância.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS:

[1] MA - Ministério da Agricultura.

Dpto. Nacional de inspeção de produtos de origem animal. *Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal*. Decreto n.o 30.691 - 29/03/50
Alterado pelo Decreto n.o 1.255 - 25/06/62

[2] Prata. L. F. (1984)

Aplicação do método de contagem microscópica no controle microbiológico do leite cru.
Tese de Mestrado - FEAA - UNICAMP

[3] Roger Veisseyre (1972)

Lactologia Técnica
Espanha, Editorial Acribia, Zaragoza, 643p

[4] Rodrigues, U. M., and R. G. Kroll (1985)

The direct epifluorescent filter technique (DEFT) increased selectivity, sensitivity and rapidity. *Journal Appl. Bacteriology*. **59**, 493-499.

[5] R. K. ROBINSON (1985)

Dairy Microbiology - Vol 1 / The Microbiology of Milk
3.a edição - England - Elsevier Applied Science Publishers Ltda., 258p

[6] Rodrigues, U.M. and Kroll, R.G. (1988)

Rapid selective, enumeration of bacteria in foods using a microcolony epifluorescence microscopy technique. *Journal of Applied Bacteriology* **64**, 65-78

[7] BRASIL - Ministério da agricultura, SNDA (1979)

Padronização de Técnicas de análises microbiológicas de produtos de origem animal.
Anti-projeto - Informativo - LANARA

- [8] Pettipher, G.L., Mansell, McKinnon, C.H. & Cousins, C.M. (1980)
Rapid membrane filtration epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. *Applied and Environmental Microbiology* **39**, 423-429.
- [9] Robert D. Byrne, Jr., and J. Russell Bishop (1990)
The limulus amoebocyte lysate assay and the direct epifluorescent filter technique as estimators of potencial shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of Food Protection* **53** 151-153.
- [10] J. S. Ploem and H. J. Tanke (1987)
Introduction to fluorescence microscopy. *Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks*, **10** 6-8.
- [11] R. K. Robinson (1996)
Modern Dairy Technology - Volume 2
England, Chapman & Hall, Cambridge, 516p
- [12] G. L. Pettipher, Y. B. Watts, S. ^a Langford & R. G. Kroll (1992)
Preliminary evaluation of COBRA, na automated DEFT instrument, for the rapid enumeration of micro-organisms in cultures, raw milk, meat and fish. *Letters in Applied Microbiology*. **14**, 206-209
- [13] Associação Brasileira de Normas Tecnicas (1987)
Alimentos: contagem de bolores e leveduras em placas. *ABNT* 01 p(MB-2750).
- [14] Champagne, C.P., Gardner, N.J., Fontaine J. and Richard J. (1997)
Determination of viable bacterial populations in raw milk within 20 minutes by using a direct epifluorescent filter technique. *Journal of Food Protection* **60** 874-876.

- [15] M. C. Easter, R. G. Kroll, L. Farr and A. C. Hunter (1987)
Observations on the introduction of the DEFT for the routine assessment of bacteriological quality. *Journal of the Society of Dairy Technology*. **40** 100-103.
- [16] Pelczar, Reid, Chan (1981)
Microbiologia - Vol. 2
São Paulo - 4.a edição - McGraw-Hill, 595p
- [17] F. K. Möllring (1968)
La microscopia desde el principio
Alemanha – Carl Zeiss, Oberkochen (Württ.) – 64p
- [18] P. Neaves, D. I. Jervis and G. A. Prentice (1987)
A comparison of DEFT clump counts obtained in eight dairy laboratories receiving replicate samples of preserved raw milk. *Journal of Society of Dairy Technology*. **40**, 53-56.
- [19] National Instruments (1996)
IMAQ-Vision for G - Reference Manual
US - Copyright - National Instruments Corporation - 252p
- [20] Millipore (1997)
Catalogo para Laboratório
Alemanha – Millipore Corporation – 248p

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA:

[1] Alais C. (1991)

Ciência da la leche. *Principios da tecnia lechera*

3.a edição - Mexico: Continental, 594p

[2] Aurelio Revilla R., M. S. A. (1971)

Tecnologia de La Leche

México , Her. Hermanos, Sucesores, AS, 157p

[3] BRASIL - Ministério da agricultura, SNDA (1981)

Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes

[4] G.L. Pettipher, Rosemary J. Fulford & L.A. Mabbitt (1983)

Collaborative trial of the direct epifluorescent filter technique (DEFT) a rapid method for counting bacteria in milk. *Journal of Applied Bacteriology* **54**, 177-182.

[5] Koch, H. A., Bandler, R., and Gibson, R. (1986)

Fluorescence microcopy procedure for quantitation of yeasts in beverages. *Applied and Environmental Microbiology* **52**, 599-601.

[6] P. Lebaron, M. Troussellier and P. Got (1994)

Accuracy of epifluorescence microscopy counts for direct estimates of bacterial numbers. *Journal of Microbiological Methods* **19**, 89-94.

[7] Pettipher, G. L., and U. M. Rodrigues (1982)

Semi-automated counting of bacteria and somatic cells in milk using epifluorescence microscopy and television image analysis. *Journal Appl. Bacteriology*. **53**, 323-329.

[8] Fifield, C.W., Hoff, J.E., Proctor, B.E. (1957)

The millipore filter for enumerating coliform organisms in milk. *Journal Dairy Science*, **40**, 588-589.