

A usabilidade da domótica na computação física na identificação de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Rafael Aragão da Silva (1)

Orientador: João Ronaldo T. Vasconcellos Jr.

Resumo

Este trabalho tem por finalidade desenvolver um protótipo baseado nos fundamentos da computação física, utilizando para isso a placa Arduino, que deverá ser uma alternativa aos equipamentos de alto custo existentes. Tal protótipo servirá para identificar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em lâminas de microscópio. Assim, servirá como equipamento que irá compor as bancadas de laboratórios de microbiologia e análises clínicas.

Palavras-chave: Arduino, computação física, bactéria e coloração de Gram.

1. Introdução

Segundo Lewinsohn (2005), consta na base de dados do CNPq que existia no Brasil, em 1996, um total de 2.190 pesquisadores atuantes em microbiologia, alocados em 137 instituições, concentradas principalmente na região Sudeste (104), seguido das regiões Sul (11), nordeste (11), Norte (7) e centro-oeste (4). Das 957 linhas de pesquisa identificadas, a grande maioria correspondia a pesquisas nas áreas de Biotecnologia (464) e Saúde (451), seguidas de Ciências Ambientais (160), Produção Animal (74) e Vegetal (58), Nutrição e Alimentação (47) e Indústria Farmacêutica (44).

Some-se aos dados do parágrafo anterior a necessidade de identificação de bactérias nos laboratórios de análise clínicas independentes e dos hospitais públicos e privados e pode-se aquilatar a importância de se desenvolver um equipamento de baixo custo que possa identificar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Este trabalho está organizado de forma a mostrar, no referencial teórico, os principais conceitos envolvendo bactéria e computação física. Facilitando, assim, o entendimento desses conceitos.

(1) Graduando em Redes de Computadores pela Faculdade Anísio Teixeira.

Na metodologia, este trabalho, procura focar como está construído o protótipo, bem como mostra o código fonte do programa necessário para o funcionamento do referido protótipo.

2. Referencial Teórico

2.1. Microbiologia

A Microbiologia (do grego: *mikros*, “pequeno”; *bios*, “vida” e *logos*, “ciência”) é o estudo dos organismos microscópicos e de suas atividades. Nesta área, devemos considerar que variados micro-organismos podem provocar infecções, e que inúmeras também são as formas de diagnóstico e identificação dos agentes etiológicos destas enfermidades. Para identificá-los, devemos analisar sua morfologia, estrutura, reprodução, fisiologia e metabolismo. Também em microbiologia são avaliados os conceitos de distribuição natural, suas relações simbióticas e as alterações físicas e químicas que provocam no meio ambiente.

Os principais organismos estudados em Microbiologia são as bactérias, os fungos, as algas e os protozoários. Quando se analisa os conceitos de Bacteriologia geral, clínica e laboratorial, leva-se em conta entendimentos básicos, aliados à importância destes micro-organismos como participantes da microbiota e como causadores de doenças.

Na parte do diagnóstico bacteriano, avulta de importância a necessidade de comentar as metodologias simples e complexas, que permitem a obtenção de resultados corretos, já que, na maioria das vezes, o paciente depende do resultado de um exame para o início do tratamento.

2.2. Coloração de Gram

Desenvolvida pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram, em 1884. Tem como fundamento o fato de que as bactérias, quando coradas por derivados próximos da rosanilina (violeta genciana, cristal-violeta, metil- violeta, etc.) e depois de tratadas pelo iodo (solução iodo-iodetada, conhecida como lugol), formam um composto de coloração escura, entre o iodo e o corante, chamado iodopararosanilina. Este composto, nas bactérias Gram-positivas, é fortemente retido e não pode ser facilmente removível pelo tratamento posterior com álcool, ao passo que nas Gram-negativas este composto é facilmente descorado pelo álcool.

Após a ação do álcool, é feita uma segunda coloração pela safranina ou fucsina de Ziehl, diluída a 1/10. Neste caso, as bactérias Gram-negativas aparecerão vermelhas, devido a cor do corante de fundo, e as Gram-positivas aparecerão roxas, pois conservam a cor do corante inicial.

Esta distinção é muito importante na sistemática bacteriana e ocorre com base nas diferenças existentes na parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram negativas já estudadas em Citologia bacteriana. Todavia, é importante sempre utilizar culturas jovens para não haver falsos resultados.

Assim, podemos formular duas regras simples:

- Os cocos geralmente são Gram +, com exceção do gênero *Neisseria* (gonococo e meningococo).
- Os bastonetes geralmente são Gram, com exceção de *Corynebacterium*, *Listeria* (cocobacilo), *Bacillus* e *Clostridium*.

2.3. Bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas

A microscopia pela coloração de Gram é o método mais comumente utilizado para a observação direta de microrganismos nas amostras clínicas, podendo fornecer um resultado presuntivo e rápido do agente infeccioso (DAUR *et al.*, 2004). As bactérias Gram-negativas surgiram de bactérias gram-positivas, através de uma sequência de vários outros grupos. Árvore filogenética mostrara evidencias através RNA das bactérias Gram positiva (GUPTA, 2001).

As bactérias Gram negativas em geral são mais resistentes do que as Gram positivas, devido a um mecanismo de proteção que elas possuem confere uma resistência a um grande número de antibióticos e agentes quimioterápicos. A membrana externa dos Gram negativa contribui para esta resistência contra uma grande variedade de agentes antimicrobianos. Como também alguns canais que limitam a penetração de solutos hidrofílicos (PLÉSIAT; NIKAIDO, 2002).

Atualmente é possível utilizar alguns meios para diferenciar as bactérias gram-positivas e gram-negativas, como a pigmentação aproximada da cor roxa. Assim, é denominada gram-negativa as que contem pigmentação aproximada da cor vermelha. Também é possível determinar a diferença por meio da estrutura da bactéria, caso seja uma estrutura simples ela é denominada positiva, casa seja estrutura complexa é denominada negativa.

Uma outra maneira possível para distinguir as bactérias gram-positivas das gram-negativas é utilizando um solvente orgânico, as amostras que descolorarem são consideradas negativas e as que permanecem com a mesma pigmentação são consideradas positivas.

É possível, ainda, estabelecer a diferença entre bactérias gram-positivas e negativas utilizando dispositivos eletrônicos que, através de espectro de cores lidos por um sensor, distinguem os dois tipos. Tais dispositivos são confeccionados conforme os princípios da computação física.

2.4. A importância de identificar bactérias

Historicamente, o desenvolvimento da Microbiologia como ciência foi fortemente influenciado pela necessidade de conhecimento sobre os microrganismos causadores de doenças no homem (ATLAS; BARTHA, 1998). Vários métodos de identificação foram desenvolvidos durante as últimas décadas. Tendo início nos métodos de cultivo asséptico desenvolvidos por Koch (1883).

Atualmente as estimativas da diversidade de alguns grupos de microrganismos estão baseadas em inferências a partir de métodos limitados que não representam a totalidade da diversidade presente no meio ambiente. Estima-se que apenas de 0,1% a 12% dos procariotos sejam conhecidos até espécie. (STORK, 1988; WILSON, 1988; BULL et al., 1992)

Tabela 01: Número conhecido e estimado de espécies microbianas em relação a material depositado em coleção de cultura.

Grupo*	Número de espécies aproximado		Material disponível em coleções de culturas		
	Conhecido	Estimado	Total por grupo	% do número de espécies conhecidas	% do número estimado de espécies
Algas	37.700 - 42.900	400.000	1.600	3,7 - 4,2	0,4
Bactérias	4.300	1.000.000	2.300	53,5	0,2
Fungos	70.600 - 72.000	1.500.000	11.500	16,0 - 16,3	0,8
Vírus	3.600	400.000	2.200	61,1	5,5

Fonte: Modificado a partir de Nisbet e Fox (1991).

2.5. Computação Física

A computação física, segundo Oliveira (2015), é uma área da computação onde o software se comunica diretamente com o hardware, sem a “tutela” de um

sistema operacional, controlando componentes eletrônicos, como sensores e atuadores, permitindo construir sistemas que consigam perceber e interagir com ambientes reais.

Computação física se refere a capacidade do usuário de tirar projetos do papel ou no caso deste trabalho, tirar o projeto de uma simples IDE para um protótipo físico. A computação física geralmente necessita de um micro controlador, que nada mais é do que um pequeno computador em um chip único, que por sua vez, pode ser adaptado em diversos projetos, por conter pouco peso e tamanho.

De acordo com Banzi (2015) A computação física utiliza elementos de eletrônica na prototipagem de novos objetos para designers e artistas. Ela envolve o projeto de objetos interativos que podem se comunicar com humanos utilizando sensores e atuadores controlados por um micro controlador

A computação física pode ser implementada utilizando-se várias plataformas disponíveis no mercado, uma delas é a placa Arduino.

2.6. Placa Arduino

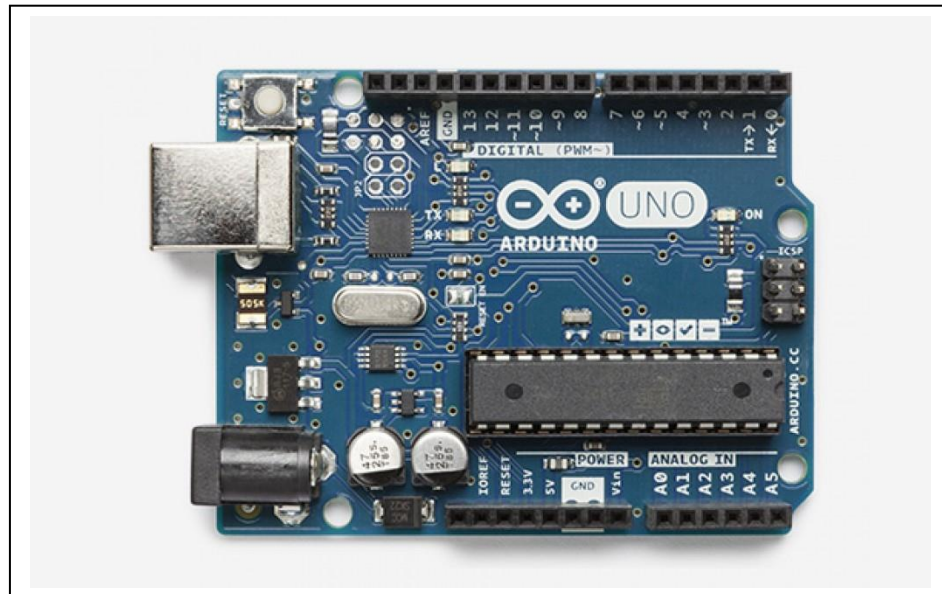
O Arduino é uma plataforma de hardware *open source*, projetada sobre o micro controlador Atmel AVR, que pode ser programado através de uma linguagem de programação chamada Processing, similar a C/C++, permitindo a elaboração de projetos de fácil prototipagem.

A placa Arduino, figura 1, foi criada em 2005 por alguns pesquisadores com o intuito de desenvolver algo que fosse barato, funcional e fácil de programar, tornando-a acessível a estudantes e projetistas amadores. Um dos grandes atrativos do arduíno seria a funcionalidade *open source*, permitindo que todo e qualquer usuário possa montar, modificar e transmiti-la da melhor maneira possível.

Segundo Massimo Banzi (2015), que é um dos criadores do arduíno, a placa é uma pequena placa micro controladora, ou seja, um circuito de pequeno porte que contém um computador inteiro dentro de um pequeno chip (o micro controlador).

Em termos mais práticos, segundo Michael McRoberts (2011) um Arduino é um pequeno computador que você pode programar para processar entradas e saídas entre o dispositivo e os componentes externos conectados a ele. Por motivos como este o arduíno é classificado por grandes pesquisadores como uma plataforma fantástica de computação física.

Figura 1: Placa Arduino Uno 3



Fonte: www.arduino.cc

2.6.1 Componentes Utilizados

No desenvolvimento do protótipo serão utilizados alguns componentes além da placa Arduino. Uma IDE (*Integrated Development Environment*), que é uma interface para que se possa programar a placa arduino e desenvolver sketch para a placa e esta, por sua vez, irá transmitir comandos para alguns componentes físicos associados à placas chamadas de Shields.

2.6.1.1 Sketch Arduino

O sketch do arduino nada mais é do que o código que é escrito pelo programador direto da IDE e que é compilado e transferido para a placa. Toda a programação é feita na IDE, figura 2, com o intuito de facilitar e tornar o processo mais produtivo.

O sketch que é construído na IDE será transmitido para a placa através de uma conexão USB e é armazenada em seu chip de memória.

Figura 2: IDE do Arduino contendo um Sketch

```

Semaforo $
// Declarando Variaveis
int Vermelho = 2;
int Amarelo = 4;
int Verde = 3;
void setup() {
  // Ligando as portas de cada LED
  pinMode(Vermelho, OUTPUT);
  pinMode(Amarelo, OUTPUT);
  pinMode(Verde, OUTPUT);
}
// Variando o momento de acender cada LED.
void loop() {
  // put your main code here, to run repeatedly:
  digitalWrite(Vermelho, HIGH);
  delay(3000);
  digitalWrite(Vermelho, LOW);
  delay(500);
  digitalWrite(Verde, HIGH);
  delay(3500);
  digitalWrite(Verde, LOW);
  delay(500);
  digitalWrite(Amarelo, HIGH);
  delay(1000);
  digitalWrite(Amarelo, LOW);
  delay(500);
}

```

Fonte: Elaborada pelo autor

2.6.1.2 Shield Arduino

Uma shield é uma placa de circuito integrado com uma funcionalidade específica, utilizada como uma placa auxiliar, que pode ser conectada ao Arduino, encaixando-se nela com o objetivo principal de expandir suas capacidades.

A título de exemplo, pode-se citar um Shields muito utilizado pelo Arduino que é o Shields Ethernet, tal componente tem a funcionalidade de conectar a placa a uma rede de computadores. Outros Shields podem proporcionar a possibilidade de conectar a placa em motores para desenvolver projetos relacionados à robótica, por exemplo.

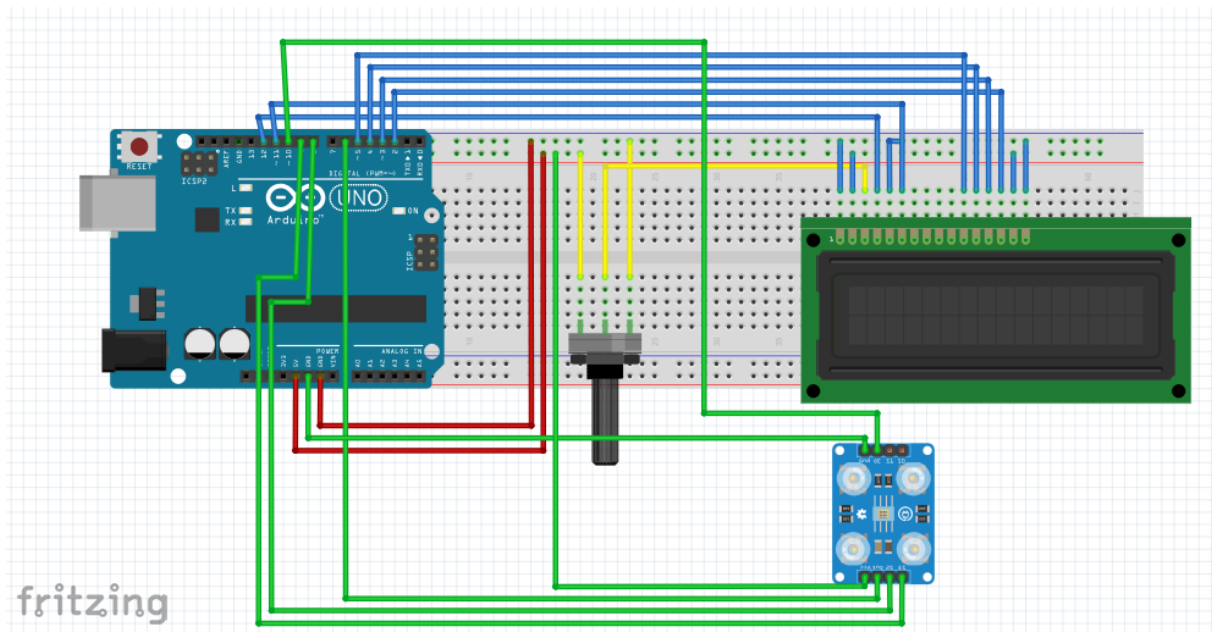
3. Metodologia

Este trabalho tem o intuito de beneficiar todo e qualquer laboratório de microbiologia ou análise clínica quer seja ele de cunho acadêmico ou comercial, proporcionando a identificação de bactérias Gram. Para tal, pretende-se desenvolver

um protótipo utilizando-se os conceitos de computação física e a placa Arduino como base (figura 1). Utilizou-se, também, outros componentes tais como sensor de cor e tela de cristal líquido. Todo o esquema necessário para a funcionalização do protótipo está descrito na Figura 3, que foi desenvolvida na plataforma digital Fritzing.

Este protótipo, trabalhando em conjunto com o aplicativo desenvolvido, atua na identificação das Bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas com um grau de assertividade deverá ser comprovada através de testes de identificação.

Figura 3: Protótipo desenvolvido na plataforma digital Fritzing



Fonte: Elaborada pelo autor

Os testes de identificação serão realizados submetendo-se lâminas de microscópios, com bactérias previamente identificadas, ao protótipo e verificando o índice de acertos na identificação. Acredita-se que um percentual entre 99% e 100% atenderá ao critério da fidedignidade do protótipo. Acredita-se, também, que uma quantidade de testes compreendida entre 1000 (mil) e 2000 (dois mil) seja satisfatória.

Este artigo pretende mostrar a viabilidade do projeto construindo o protótipo e a programação necessária (código fonte utilizando a IDE do Arduino). Bem como realizando os testes preliminares a fim de mostrar o funcionamento do protótipo.

Convém ressaltar que após a prototipagem ainda será necessário melhorar o “*design*” do protótipo a fim de passar para a próxima etapa que é a industrialização do projeto. Tal etapa não será contemplada neste artigo.

3.1. Codificação

Utilizando-se a IDE Arduino, desenvolveu-se o código fonte (figura 4) que depois de compilado foi gravado na memória da placa Arduino a fim de possibilitar a captura dos dados obtidos pela leitura do sensor RGB e mostrá-la no *display* de cristal líquido. Foram adicionados ao código fonte alguns comentários a fim de facilitar seu entendimento.

Figura 4: código fonte

```
#include <LiquidCrystal.h> //Inclui a biblioteca do LCD
#include <MD_TCS230.h> //Inclui a biblioteca do sensor TSC230
#include <FreqCount.h> //Inclui a biblioteca para medir a frequencia do
sinal

#define S2_OUT 8
#define S3_OUT 9
#define OE_OUT 10

MD_TCS230 CS(S2_OUT, S3_OUT, OE_OUT);
LiquidCrystal lcd(12, 11, 5, 4, 3, 2); //Configura os pinos do Arduino para se
comunicar com o LCD

colorData rgb;
```

Fonte: desenvolvido pelo autor

Figura 4: código fonte (continuação)

```

int temp; //Inicia uma variável inteira(temp), para escrever no LCD a contagem do
tempo
int sensor; //Inicia a variável inteira(sensor), para escrever no LCD a cor do LED
int readSensor(int i)
{
  static bool waiting;
  if (!waiting)
  {
    CS.read();
    waiting = true;
  }
  else
  {
    if (CS.available())
    {
      CS.getRGB(&rgb);
      waiting = false;
    }
  }
  return rgb.value[i];
}
void setup()
{

  lcd.begin(16, 2); //Inicia o LCD com dimensões 16x2(Colunas x Linhas)
  lcd.setCursor(4, 0); //Posiciona o cursor na primeira coluna(4) e na primeira
linha(0) do LCD
  lcd.print("Bateria"); //Escreve no LCD "Bateria"

}

void loop()
{
  lcd.setCursor(0, 1); //Posiciona o cursor na segunda linha(1) do LCD
  lcd.print(readSensor(TCS230_RGB_R)); //Esta linha e as linhas a seguir
definem a saída da leitura do sensor RGB

  lcd.print(";");
  lcd.print(readSensor(TCS230_RGB_G));
  lcd.print(";");
  lcd.println(readSensor(TCS230_RGB_B));
  delay(100);
}

```

A biblioteca MD_TCS230, inserida no código fonte, conforme se observa na figura 4, não será mostrada neste trabalho a fim de que se mantenha o devido sigilo sobre a codificação da mesma.

4. Conclusão

Conforme se estabeleceu no início deste projeto o objetivo foi definido como, baseado em Arduino e utilizando-se os conceitos de computação física, construir um protótipo de um equipamento eletrônico com a finalidade de identificar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Considerando-se que o protótipo foi construído, dá-se por atingido os objetivos deste trabalho. Entretanto, não houve tempo para a realização da massa de testes necessários a viabilizar o protótipo para a próxima etapa que é a industrialização. Assim, sugere-se que tais testes sejam realizados em trabalhos futuros.

Referências

ARDUINO. <https://store.arduino.cc/usa/arduino-uno-rev3>. Acessado em 02 de outubro de 2017.

BANZI, Massimo. **Primeiros passos com Arduino**. São Paulo: Novatec Editora, 2015.

DAUR, A.V. *et al.* SENSITIVITY OF GRAM STAINING FOR EARLY DIAGNOSTIC OF INFECTIONS IN STERILE BODY SITES. **Visão Acadêmica** v. 5, n. 2, p. 91–94 , 2004.

GRAM, Christian. The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. **General Microbiology** v. 2, p. 216–218 , 1884.

GUPTA, Radhcy S. The branching order and phylogenetic placement of species from completed bacterial genomes, based on conserved indels found in various proteins. **International Microbiology** v. 4, n. 4, p. 187–202 , 2001.1139-6709 (Print)r1139-6709 (Linking).

LEWINSOHN, Thomas Michel. **Avaliação do estudo do conhecimento da biodiversidade brasileira – volume I**. Brasília: MMA, 2005.

OLIVEIRA, Cláudio Luis Vieira. **Arduino descomplicado: como elaborar projetos de eletrônica**. São Paulo: Érica, 2015.

