

AUTOMAÇÃO DE MEDIDAS INTERFEROMÉTRICAS

Eder Barboza Kapisch¹

Fábio Luiz Marinho de Oliveira¹

Ana Carolina de Andrade¹

Felipe Kitamura²

Rachel Rocha Pinheiro Machado³

Deborah Faragó Jardim⁴

Elton Soares de Lima Filho⁵

Bernhard Lesche⁶

RESUMO

O presente trabalho relata o desenvolvimento de um equipamento que mede a atividade metabólica em até 96 amostras bacterianas interferometricamente. A finalidade deste equipamento se destina a pesquisas sobre bactérias de crescimento lento como o *Mycobacterium tuberculosis*. Medidas interferométricas podem informar sobre a atividade metabólica de forma precisa e em tempo real. Tipicamente estas medidas levam algumas semanas e eles acontecem de forma contínua. Por esta razão, o equipamento deve trabalhar de forma automática. Neste último ano avançamos na construção de um robô que transporta amostras entre um armário e um interferômetro. Este robô possui um braço que deve retirar uma fileira de 4 porta-amostras do armário, levá-la até a posição do interferômetro, introduzir a fileira dentro do interferômetro, posicionar os porta-amostras com precisão, retirar a fileira do interferômetro e levá-la de volta para sua origem. A maior parte da mecânica deste robô já foi construída, bem como grande parte da eletrônica que controla os movimentos. No momento, estamos desenvolvendo software e firmware, sendo possível controlar movimentos do braço robótico em duas dimensões, bem como a eletrônica com a correspondente firmware que coordena estes movimentos e se comunica com um computador que controla todo o processo de medida interferométrica.

Palavras-chave: Interferometria. Automação. Micobactéria.

1 Bolsista do Programa BIC/UFJF

2 Pós Graduação Biologia UFJF

3 SUPREMA – Juiz de Fora, MG – Brasil.

4 Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, ICTM - Teófilo Otoni, MG – Brazil.

5 Department of Engineering Physics, École Polytechnique de Montréal – , Montréal, Canada.

6 Professor orientador do Instituto de Ciências Exatas - Departamento de Física , Universidade Federal de Juiz de Fora; Juiz de Fora MG (lesche@fisica.ufjf.br).

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença grave causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Situações de queda da imunidade dos hospedeiros e desenvolvimento de cepas resistentes das micobactérias causadoras têm contribuído para o aumento da prevalência dessa doença (Pfyffer et al. 2005, Montoro & Rodriguez 2007, Frieden et al. 2003, Chan, ED.& Iseman 2002, Martin et al. 2008).

Os Testes de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA) orientam a terapêutica e permitem a investigação de novas drogas antimicobacterianas. Pesquisas envolvendo a busca por novos antimicobacterianos esbarram em dificuldades inerentes às espécies do complexo *M. tuberculosis*, como o elevado tempo de crescimento.

Diversas técnicas permitem a identificação do crescimento micobacteriano, no entanto, técnicas convencionais baseadas no crescimento das colônias, utilizando meios de cultura seletivos e enriquecidos, ainda permanecem como padrão-ouro.

A figura 1 mostra uma fotografia de três culturas de *M. bovis*. Os pontos esbranquiçados são aglomerados de bactérias, chamados de colônias. Nos testes convencionais a densidade destas colônias ou o halo formado em torno dos discos com antibióticos são usados para avaliar o desenvolvimento bacteriano. Esta contagem é bastante imprecisa. Às vezes aparecem pontos na imagem que poderiam ser colônias, mas são tão pequenos que sua identificação fica duvidosa. Às vezes aparecem aglomerados grandes que podem ser uma junção de diversas colônias. Somente depois de 2 a 3 semanas de crescimento estas contagens podem ser feitas.



Fig. 1 - Colônias de *M. bovis* durante Teste de Sensibilidade a Antibiótico por disco de difusão

Existem técnicas sofisticadas para medir a atividade bacteriana de forma quantitativa. Um método bem conhecido usa nutrientes com marcadores radioativos e a contagem de decaimentos radioativos na fase gasosa pode informar sobre a atividade metabólica das bactérias. Existem também diversos métodos com marcadores químicos que permitem um monitoramento das bactérias de forma mais quantitativa e precisa. Geralmente estes métodos são onerosos e precisam de agentes químicos especiais. (Clinical and Laboratory Standards Institute / NCCLS. 2003).

Em 2003, mostramos que o crescimento de *M. bovis* pode ser medido de forma precisa, observando alterações do índice de refração do meio de cultura com medidas interferométricas (Jardim et al., 2003). Nesta técnica, a fase de uma onda de luz que atravessa o meio de cultura é alterada pela mudança da composição química do meio. Ao somar esta onda com uma onda de referência, esta alteração de fase resulta numa alteração de intensidade da luz. Esta pode ser observada e o monitoramento das alterações permite caracterizar a atividade metabólica das bactérias.

Esta experiência piloto (Interferômetro de Atividade Metabólica I) era ainda muito complicada e se podia examinar somente uma única amostra. Para transformar o método numa ferramenta de

pesquisa em biologia e medicina era necessário construir um aparato que fosse capaz de medir várias amostras. Como as medidas levam tipicamente algumas semanas e têm que ser feitas de forma contínua, era necessário construir um aparato que funcionasse de forma automática. Com três anos de intensos trabalhos, construímos um aparato (Interferômetro de Atividade Metabólica II) que consegue medir 19 amostras simultaneamente. Com amostras que foram avaliadas numa máquina de contagem de bactérias calibramos este aparato (Machado et al., 2008). O método permite detectar atividade bacteriana de forma bastante sensível e pode revelar a presença de bactérias resistentes a um determinado antibiótico em situações nas quais métodos convencionais indicam a total eficiência do antibiótico (Machado et al., 2008). A figura 2 mostra exemplos de curvas de crescimento bacteriano. A grandeza Δn mostrada no eixo vertical é a diminuição do índice de refração causada pelo consumo de nutrientes.

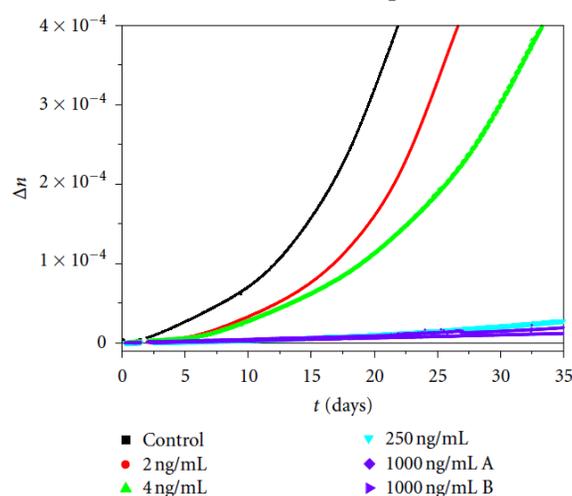


Fig. 2 - Exemplos de curvas de crescimento. A grandeza Δn mostrada no eixo vertical é a diminuição do índice de refração causada pelo consumo de nutrientes. As concentrações indicadas são do antibiótico rifampicina, que foi adicionado às amostras, exceto na amostra controle.

O presente trabalho descreve o desenvolvimento inicial de um equipamento (Interferômetro de Atividade Metabólica III) que deve medir a atividade metabólica de bactérias com crescimento lento em até 96 amostras interferometricamente com uma precisão ainda maior que aquela alcançada com o interferômetro de 19 amostras.

METODOLOGIA

Defeitos e imperfeições de um Interferômetro de Atividade Metabólica, que havia sido construído anteriormente, foram analisados criticamente. O método de planejamento quantitativo foi usado na concepção de um novo interferômetro que corrige os defeitos detectados como explicitado no desenvolvimento.

PRINCÍPIOS E DESENVOLVIMENTO DO PROJETO INTERFERÔMETRO DE ATIVIDADE METABÓLICA III

A concepção básica deste novo interferômetro é a mesma da segunda geração. Amostras de bactérias são mantidas em porta-amostras que têm dois compartimentos com janelas e estes compartimentos contêm meio de cultura líquido. Somente um dos compartimentos contém bactérias. A mudança da

diferença dos índices de refração dos dois líquidos causada pela atividade metabólica das bactérias é medida com a ajuda de um interferômetro de Michelson (compare Fig. 3). Mas certos detalhes deste processo são diferentes nesta terceira geração do Interferômetro de Atividade Metabólica.

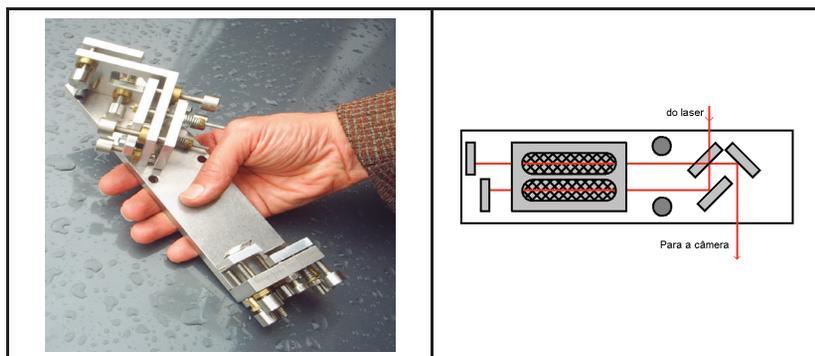


Fig. 3 - Interferômetro de Michelson dedicado ao monitoramento do crescimento de bactérias. Esquerda: Fotografia do interferômetro. Direita: Esquema da passagem de luz.

No equipamento anterior, os porta-amstras eram posicionados num disco rotativo que os levava periodicamente para dentro do interferômetro (Machado 2008; 2012). Esta solução do problema de manuseio de muitas amostras não seria praticável com 96 porta-amstras. O disco rotativo teria que ser muito grande e isto dificultaria a tarefa de manter a temperatura do equipamento constante. A interferometria reage muito sensivelmente a mudanças de temperatura e é necessário garantir uma constância da mesma com precisão de um milésimo de grau. Por esta razão preferimos organizar os porta-amstras numa espécie de armário com fileiras de 4 porta-amstras distribuídos em 6 colunas e 4 linhas.

É planejado que um braço robótico apanhe as fileiras de porta-amstras do armário e as leve para dentro do interferômetro. A figura 4 mostra um desenho do braço na frente do armário. Apenas três das seis colunas de porta-amstras são mostradas no desenho.

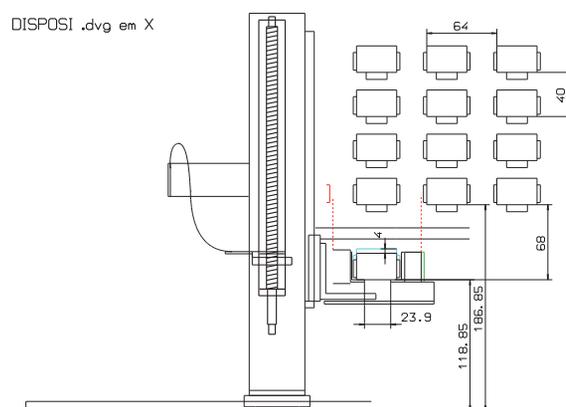


Fig. 4 - Braço robótico na frente de três colunas de porta-amstras.

Depois de ter retirado uma fileira de porta-amstras do armário e ter levado ao interferômetro, o braço deve depositar os porta-amstras um a um em três pinos que mantêm a amostra precisamente posicionada dentro do interferômetro.

Estas tarefas precisam de movimentos em três direções x (movimento lateral na frete do armário), y (para dentro e para fora do armário) e z (vertical). Os movimentos x e z são executados com a ajuda de fusos e motores de passo. Os movimentos na direção y são efetuados com um motor

linear, que foi construído por nossa equipe. Os três motores são acionados com a ajuda de circuitos integrados programáveis (PIC 16F628A). Um PIC 18F4550 controla estes três PICs 16F628A e faz a conexão com um computador que controla todo o processo de medida, analisa os dados e armazena os resultados. As posições são monitoradas com a ajuda de sensores ópticos digitais e são lidas pelos PIC16F628A. Os mesmos pinos destes PICs que são usados para a leitura da posição do braço robótica servem para receber informação a respeito da posição desejada. Esta informação é enviada pelo PIC18F4550 com um sinal que desliga o respectivo sensor óptico e comunica ao PIC16F628A que o sinal recebido nos pinos de posição não correspondem à posição actual do braço mecânico, mas à posição desejada.

A figura 5 mostra o esquema elétrico que controla os movimentos nas direções y e z. As partes marcadas em cor azul-turquesa não estão nesta placa de circuito impresso do resto deste esquema, mas estão nos sensores de posição.

A figura 6 mostra os transistores que ligam as bobinas do motor da direção z. As placas de circuito foram fabricadas com a técnica de transferir uma impressão a laser num papel couchê com calor para a placa de circuito e posterior ataque químico com cloreto de ferro (III).

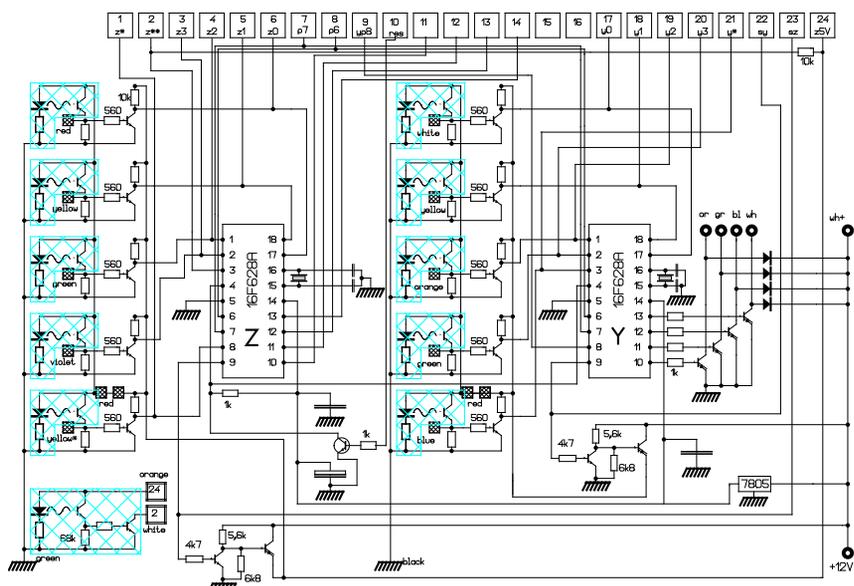


Fig. 5 - Circuito responsável pelos movimentos y e z

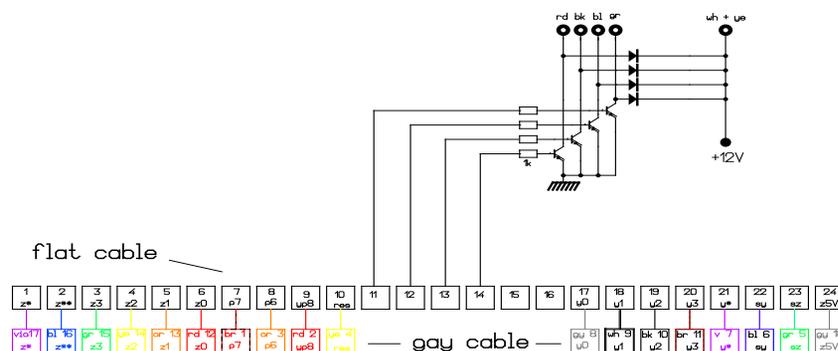


Fig. 6 - Transistores de potência para o motor z, e passagem de fios do cabo flexível (flat) para o cabo fixo (gay).

A figura 7 mostra uma fotografia do braço robótico.

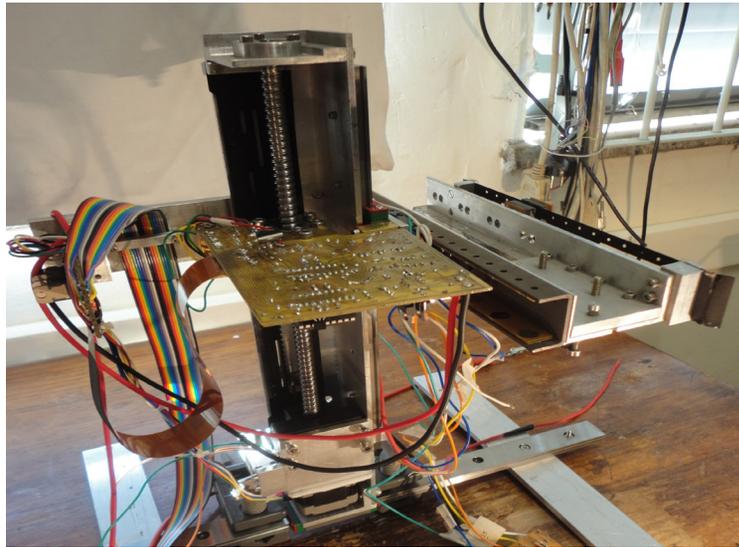


Fig. 7 - Braço robótico para transporte de porta-amostras.

Além da substituição do disco rotativo por um braço mecânico que manuseia os porta-amostras, há uma mudança fundamental na leitura do sinal interferométrico em relação ao interferômetro da segunda geração. No interferômetro anterior, os dois feixes de luz que interferem se cruzam com um pequeno ângulo de tal forma que se gerem franjas espaciais que eram captadas por uma câmera CCD. As imagens destas franjas eram analisadas por um computador de maneira automática. A informação relevante da fase relativa dos dois feixes era codificada pela posição destas franjas. Este método tem uma desvantagem. Manchas escuras provenientes de imperfeições ópticas, por exemplo sujeiras nas janelas dos porta-amostras ou colônias bacterianas grandes, causam necessariamente pequenos erros na interpretação automática das franjas. Este efeito provoca erros periódicos nas curvas de crescimento.

No Interferômetro de Atividade Metabólica III, usaremos feixes bem paralelos de tal forma que o fotodetector receberá uma única franja de interferência. A determinação da fase relativa das ondas será feita variando a posição de um dos espelhos do interferômetro com a ajuda de um elemento piezo elétrico que é acionado por uma voltagem variável. Este movimento do espelho faz uma varredura da fase relativa das ondas e provocará alterações periódicas na intensidade de luz captada pelo fotodetector. A relação das voltagens que acionam o elemento piezoelétrico e sinal óptico captado no fotodetector permite determinar a fase relativa das duas ondas de luz que interferem. Para poder elaborar um programa de computador que determina a fase relativa das ondas de luz a partir de um registro de pares de dados <Voltagem, Intensidade de Luz> é necessário conhecer qual é a relação entre voltagem aplicada ao elemento piezoelétrico e magnitude de deslocamento do espelho. Esta dependência foi medida interferometricamente e o resultado está representado na figura 8. Cada unidade do eixo vertical corresponde a um deslocamento do espelho de 0,3164 micrômetros. Infelizmente podemos notar que a relação entre posição de espelho e voltagem não é uma função. Existe uma histerese. Este fato tornará o programa de computador, que analisa os dados, mais complicado.

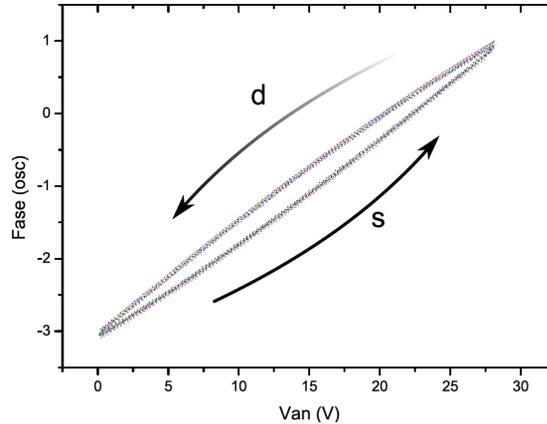


Fig. 8 - Calibração do um elemento piezoelétrico que será usado para fazer uma varredura de fase. As setas indicam subida (s) de descida (d) da voltagem.

CONCLUSÃO

Neste trabalho de Iniciação Científica avançamos no desenvolvimento de um equipamento relativamente complexo que serve para um monitoramento automático e preciso do crescimento de bactérias. A construção envolve tarefas de mecânica fina, automação, programação, interferometria e estabilização de temperatura. No trabalho apresentado, concentramos esforços na parte de robótica que cuida da troca e do posicionamento de porta-amostras. Foi possível estabelecer a comunicação entre computador e um PIC18F4550 via porta USB e a comunicação entre PIC18F4550 e PICs PIC16F628A. Conseguimos controlar os movimentos de um braço robótico na direção vertical. Movimentos numa direção horizontal também foram testados, mas ainda precisam ser melhorados em termos de precisão.

Agradecimentos: Agradecemos pelas bolsas de iniciação recebidas durante todo o projeto e pelo auxílio da FAPEMIG (Projeto (CEX – APQ-00246-10)

AUTOMATION OF INTERFEROMETRIC MEASUREMENTS

ABSTRACT

The present work describes the development of an apparatus that measures the metabolic activity of 96 bacterial samples through an interferometric method. This equipment can be applied in the researches of slowly growing bacteria such as *Mycobacterium tuberculosis*. Interferometric measurements can provide information on the metabolic activity accurately and in real time. Typically these measures take a few weeks and they happen continuously. For this reason, the equipment should work automatically. In the past year we moved forward in building a robot that transports samples between a rack and an interferometer. This robot has an arm that should remove a row of 4 sample holders from the rack, take it to the position of the interferometer, insert the row into the interferometer, position the sample holders with precision, remove the row and take it back to its origin. Most of this mechanical robot is constructed and the electronics that controls the movements too. We are currently developing software and firmware, being able to control the robotic arm movements in two dimensions, as well as electronics with the

corresponding firmware that coordinates these movements and communicates with a computer that controls the whole process of the interferometric measurement.

Keywords: Interferometry. Automation. Mycobacteria.

REFERÊNCIAS

CHAN, E.D.; ISEMAN, M.D. Current medical treatment for tuberculosis. **British Medical Journal**. 325: 1282-1286, 2002.

FRIEDEN, T.R.; STERLING, T.R.; MUNSIFF, S.S.; WATT, C.J.; DYE, C. Tuberculosis. **Lancet**, 362: 887-899, 2003.

JARDIM, D.F.; SANTIAGO NETO, R.B.; MACHADO, R.R.P.; AARESTRUP, F.M.; MENDONÇA J.P.R.F.; LESCHE, B. Observing bacterial activity interferometrically. **Eur. Biophys J.** 32:159-162, 2003.

MACHADO, R.R.P.; DUTRA, R.C.; BARBOSA, N.R.; DUARTE, R.S.; SOARES, G.L.G.; LESCHE, B.; KAPLAN, M.a.C. Metabolic Activity Interferometer: A Powerful Tool for Testing Antibiotics. **Journal of Sensors**, disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/js/2012/493797/ref/>>. Article ID 493797, doi:10.1155/2012/493797 Vol. 2012.

MACHADO, R.R.P.; LIMA FILHO, E.S.; JARDIM, D.F.; FERREIRA, M.A.A.; DE FARIA, C.G.; DUARTE, R.S.; LESCHE, B. Metabolic activity interferometer: description and calibration of an interferometric method to measure growth of mycobacteria. **Eur Biophys Journal**, 38: 111-119, 2008.

MARTIN, A.; PANAIOTOV, S.; PORTAELS, F. The nitrate reductase assay for therapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. **J. Antimicrob. Chemother.**, 62: 56-64, 2008.

MONTORO, E.; RODRIGUEZ, R. Global burden of tuberculosis. *In: Tuberculosis 2007 - from basic science to patient care.* PALOMINO, J.C., LEÃO, S.C.; RITACCO, V. www.tuberculosis-textbook.com, p. 263-282, 2007.

NCCLS. 2003 - Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard. V. 23 (18), M24-A.

PALOMINO, J.C.; LEÃO, S.C.; RITACCO, V. Tuberculosis - from basic science to patient care. Disponível em: <www.tuberculosis-textbook.com>. p.635-660. 2007.

PFYFFER, G.E. and VINCENT, V. *Mycobacterium tuberculosis complex, Mycobacterium leprae, and other slow growing mycobacteria.* *In: Borriello, S.P.; Murray, P.R.; Funke, G. Topley And Wilson's microbiology and microbial infections.* Washington D.C., USA: ASM Press, 2005.