

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Validação de Método Baseado em Visão Computacional para
Automação da Contagem de Viabilidade de Leveduras em
Indústrias Alcooleiras.

Autor: Arnaldo Ibanhe Mongelo
Orientadora: Prof^a. Dra. Marney Pascoli Cereda
Co-Orientador: Prof. Dr. Hemerson Pistori

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Julho-2012

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Validação de Método Baseado em Visão Computacional
para Automação da Contagem de Viabilidade de Leveduras em
Indústrias Alcooleiras.

Autor: Arnaldo Ibanhe Mongelo
Orientadora: Prof^a. Dra. Marney Pascoli Cereda
Co-Orientador: Prof. Dr. Hemerson Pistori

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Agropecuária.”

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Julho – 2012

A Pedra

"O distraído nela tropeçou...

O bruto a usou como projétil.

O empreendedor, usando-a, construiu.

O camponês, cansado da lida, dela fez assento.

Para meninos, foi brinquedo.

Drummond a poetizou.

Já, David matou Golias, e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela escultura...

E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no Homem!

Não existe 'pedra' no seu caminho que você não possa aproveitá-la para o seu próprio crescimento."

(Fenelon Portilho)

Ao
meu pai Jorge Mongelo (*in memoriam*) e a minha
mãe Josefina Ibanhe
que me mostraram que a honestidade
e o respeito são essenciais à vida.

A
minha esposa Denise
pela motivação, incentivo e
companheirismo.

Ao
meu filho Breno
que muitas vezes privou da
minha ausência e falta de
atenção.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por sempre estar ao meu lado sendo o meu *Porto Seguro* e por todas as coisas maravilhosas que me foram concedidas.

À Empresa Belt do Brasil, pela oportunidade oferecida e apoio para a realização deste trabalho.

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul - FUNDECT, pela bolsa de estudos.

A minha orientadora Prof^a Dra. Marney por seu apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram a execução deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Hemerson Pistori pelo incentivo e pelo apoio constantes.

Ao Prof Dr. Jeferson Pistori pelo constante apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UCDB.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da UCDB, pelos valiosos ensinamentos.

Ao técnico de laboratório do CeTeAgro Ismael Thomazelli, pelo auxílio na realização das análises.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

ARNALDO IBANHE MONGELO, filho de Jorge Mongelo e Josefina Ibanhe, nasceu na cidade de Porto Murtinho, estado de Mato Grosso do Sul, no dia 26 de Julho de 1972. Atuou como técnico de laboratório em análises de solos e tecido vegetal, entre o período de 1995 a 2009 na Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal – UNIDERP e Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. No ano de 2005 ingressou no curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Católica Dom Bosco, concluindo o mesmo em 2008. Durante este período desenvolveu pesquisas relacionadas à aplicação superficial de calagem, aplicação de gesso agrícola, assim como trabalhos com penetrometria. Em Junho de 2009, começou a ministrar aulas em um curso Técnico em Açúcar e Álcool no Instituto Educacional Paulo Freire. Em Agosto de 2009, como aluno especial iniciou o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em nível de Mestrado. E em Fevereiro de 2010 ingressou regularmente no Programa na área de concentração Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, na Universidade Católica Dom Bosco, realizando estudos na área de fermentação alcoólica com ênfase em leveduras.

SUMÁRIO

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1- INTRODUÇÃO	1
2-REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1.CANA-DE-AÇÚCAR.....	4
2.1.1.Histórico e caracterização	4
2.1.2. Aspectos econômicos.....	6
2.1.3. Caldo de cana	8
2.2. ETANOL.....	10
2.2.1. Características	10
2.2.2. Produção de etanol	11
2.3. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	14
2.4. LEVEDURAS.....	16
2.4.1. Contagem de leveduras	18
2.4.1.1.Contagem por plaqueamento	19
2.4.1.2. Contagem pela câmara de Neubauer	21
2.4.1.3. Contagem automatizada	23
2.5. VISÃO COMPUTACIONAL	24
3-REFERÊNCIAS	28
4- OBJETIVOS	36
4.1. Objetivos gerais.....	36
4.2. Objetivos específicos	36
5- CONSIDERAÇÕES FINAIS	60

Primeiro Artigo:

VALIDAÇÃO DE MÉTODO BASEADO EM VISÃO COMPUTACIONAL PARA AUTOMAÇÃO DA CONTAGEM DE VIABILIDADE DE LEVEDURAS EM INDÚSTRIAS ALCOOLEIRAS.	37
Resumo.....	37
Abstract.....	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1. Extração e coleta de caldo	41
2.2. A fermentação alcoólica.....	41
2.3. Avaliação das células de leveduras por microscópio óptico.....	41
2.4. Avaliação e contagem das células de leveduras pelas imagens captadas	41
2.5. Avaliação das células de leveduras por contagem pelo BioViC.....	41
2.5.1. Pré-processamento	42
2.5.2 Extração de atributos.....	42
2.5.3 Classificação das leveduras.....	42
2.6. Contagem das células viáveis de leveduras por plaqueamento.....	42
2.7. Análise estatística	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.CONCLUSÕES	45
5.REFERÊNCIAS	45

Segundo Artigo:

PRECISÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURAS COM CORANTE VITAL EM IMAGENS CAPTURADAS EM CAMARA DE NEUBAUER COM USO DO “SOFTWARE” BIOVIC PARA AUTOMAÇÃO.....	47
Resumo.....	47
Abstract.....	47
1. INTRODUÇÃO	48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1. Extração e coleta de caldo	52

2.2. A fermentação alcoólica	52
2.3. Contagem das células viáveis de leveduras por plaqueamento.....	53
2.4. Coloração das células de leveduras viáveis por azul de metileno.....	53
2.4.1. Contagem de células viáveis em imagens capturadas da câmara de Neubauer por visão humana.....	53
2.4.2. Avaliação das células viáveis de leveduras por contagem pelo <i>software</i> BioViC	53
2.5. Análise estatística	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4. CONCLUSÕES	58
5. REFERÊNCIAS	58

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1- localização da produção comercial da cana-de- açúcar	7
Figura 2- Rotas tecnológicas para produção de etanol	11
Figura 3- Fluxograma da produção de açúcar e etanol de cana-de-açúcar	13
Figura 4- Esquema explicativo do procedimento para execução da técnica de diluições seriadas e plaqueamento em placas e contagem	20
Figura 5- Câmara de Neubauer.....	21
Figura 6- Esquema do quadrante e retículos da câmara de Neubauer.....	21
Figura 7- Sequência de ações para aquisição e processamento de uma imagem ...	24

Segundo artigo:

Figura 1- Câmara de Neubauer com marcações em quadrantes de medidas conhecidas e pontos de amostragem para contagem.....	53
--	----

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1- Composição da cana-de-açúcar	5
Tabela 2- Composição química do caldo da cana-de-açúcar	10

Primeiro artigo:

VALIDAÇÃO DE MÉTODO BASEADO EM VISÃO COMPUTACIONAL PARA AUTOMAÇÃO DA CONTAGEM DE VIABILIDADE DE LEVEDURAS EM INDÚSTRIAS ALCOOLEIRAS

Tabela 1- Valores médios para as três técnicas de contagens de células de leveduras viáveis e inviáveis, em amostras coletadas de fermentação alcoólica, em °Brix 6 (médias de três repetições)	43
Tabela 1- Valores médios para as três técnicas de contagens de células de leveduras viáveis e inviáveis, em amostras coletadas de fermentação alcoólica, em °Brix 3 (médias de três repetições)	44

Segundo artigo:

PRECISÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURAS COM CORANTE VITAL EM IMAGENS CAPTURADAS EM CAMARA DE NEUBAUER COM USO DO “SOFTWARE” BIOVIC PARA AUTOMAÇÃO

Tabela 1- Número de células viáveis de leveduras em amostras de fermentação a °Brix 12 contadas em placas e avaliadas por corante azul de metileno em imagens captadas em lâmina de Neubauer com e sem quadrantes (média de 3 repetições).	55
Tabela 2- Número de células viáveis de leveduras em amostras de fermentação a °Brix 6 contadas em placas e avaliadas por corante azul de metileno em imagens captadas em lâmina de Neubauer com e sem quadrantes (média de 3 repetições).	56
Tabela 3- Número de células viáveis de leveduras em amostras de fermentação a °Brix 3 contadas em placas e avaliadas por corante azul de metileno em imagens captadas em lâmina de Neubauer com e sem quadrantes (média de 3 repetições).	56

LISTA DE ABREVIATURAS

BNDES: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

CCD: Charge Coupled Device

CGEE: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos

CEPAL: Comissão Econômica para a América Latina e o Caribe

CIB: Conselho de Informações sobre Biotecnologia

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

CTC: Centro Tecnologia Canavieira

DNA: Desoxyribonucleic acid

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO: Food and Agriculture Organization

IAF: Índice de Área Foliar

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

UFC: Unidade formadora de colônias

UNICA: União da indústria da cana-de-açúcar

RESUMO

A produção de etanol de cana de açúcar pode ser considerada uma fonte energética natural, limpa e renovável. O Estado de Mato Grosso do Sul apresenta grande potencial para o crescimento do setor sucroalcooleiro o que exige maior eficiência do processo. No Brasil o setor vem evoluído nos últimos anos, mas a mecanização do setor agrícola não foi acompanhada pela área industrial. A medida da viabilidade celular de leveduras que permite estabelecer a rapidez e rendimento em álcool exige o plaqueamento em meios de cultivo e 48 horas de incubação. Esse método clássico não pode ser usado nas destilarias porque a fermentação alcoólica termina em cerca de 10 horas. Por isso as usinas adaptaram um método rápido, baseado em uso de corante vital, que apresentou poucas melhorias em relação ao que tem sido usado no Brasil há 50 anos. A análise exige um técnico treinado e continua a ser feita de forma manual, demorada e sujeita a erros que diminuem o tempo de tomada de decisão e comprometem o custo de produção. Por outro lado a informática é adequada para ser usada em processos de medição fastidiosos. A pesquisa realizada por uma equipe multidisciplinar teve como objetivo validar um programa de computador para automação desta análise com eliminação da visão humana. Esse *software* denominado BioViC baseado em visão computacional foi usado para contar células viáveis e inviáveis de leveduras. Essa técnica foi comparada com os métodos de plaqueamento e visão humana. Para isso amostras foram coletadas ao longo de uma fermentação. O número de células viáveis foi estabelecido pelas colônias formadas em placas de Petri contendo meio de cultura. As mesmas amostras foram coradas com azul de metileno e as leveduras viáveis e não viáveis foram contadas em câmara de Neubauer, usando microscópio óptico com captação de imagens. Essas mesmas imagens foram processadas no *software* com técnicas de pré-processamento, segmentação e extração de atributos para selecionar as leveduras viáveis e inviáveis pelos tons. Quando o porcentual de acerto obtido na avaliação automatizada pelo “software” foi comparado à contagem em placas (padrão) e com o método usado nas usinas, os resultados mostraram que o acerto

foi maior para as células coradas de azul (inviáveis) do que para as incolores (viáveis). Os resultados também confirmaram que a contagem com corante vital subestima o número de células viáveis pelo plaqueamento. O experimento demonstrou que a contagem por visão humana podia ser feita diretamente no microscópio ou nas mesmas imagens captadas, pois os números não diferiram estatisticamente. Verificou-se também que as linhas que delimitam a câmara de Neubauer atrapalhavam a captação das imagens. Para ajustar a metodologia um novo experimento foi realizado. As leveduras viáveis foram também contadas em placa de Petri como no experimento anterior, mas a captação de imagens para avaliação por visão humana foi feita em duas regiões da câmara de Neubauer. Uma área selecionada foi a dos quadrantes com linhas e a outra, a sem linhas. Posteriormente todas as imagens foram submetidas às técnicas de visão computacional. Desta vez as contagens obtidas pelo “software” apresentaram correlação significativa com os valores de contagens obtidas nas placas e pela visão humana, mostrando a potencialidade de automatizar a avaliação de células viáveis de leveduras nas destilarias, diretamente em imagens capturadas após coloração com corante vital azul de metileno.

Palavras – chave: Automação. Etanol. Inovação. Leveduras viáveis. Visão computacional.

ABSTRACT

The production of ethanol from sugarcane can be considered a natural source of energy, clean and renewable. The Brazilian state of Mato Grosso do Sul has a great potential for growth on this sector which requires increases in efficiency. In Brazil, the sector has progressed in recent years, but the agriculture mechanization of has not been followed by the same in the industry. The cell viability measurement that allows the establishment of the speed and performance in ethanol still requires plating in culture media with 48 hours of incubation. This classic method cannot be used in distilleries because the alcoholic fermentation finishes in about 10 hours. So the plants have adapted a rapid method based on the use of vital dye, which showed little improvement over what has been used in Brazil for 50 years. The analysis requires a trained technician and is still made manually, is time-consuming and can cause errors that decrease the time for decision making and undertake the cost of production. Moreover the automation is suitable for use in measuring tedious processes. A research conducted by a multidisciplinary team aimed to validate a computer program for automation of this analysis, eliminating the need of human vision. This "software" based on computer vision was used to count viable and viable yeast cells. This technique was compared with the methods of plating and human vision. To this, end samples were collected along an alcoholic fermentation. The number of viable cells was established by the colonies formed in a Petri dish containing culture medium. The same samples were stained with methylene blue and viable yeasts were counted in a Neubauer chamber, using an optical microscope with image capture. These same images were processed in the "software" with the techniques of pre-processing, segmentation and feature extraction to select the viable and unviable yeasts by their colors and samples tones. When the percentage of correct answers obtained by the automated evaluation of the "software" was compared to the plate count (default) and the method used in the distilleries, the results showed that the accuracy was higher for blue-stained cells (unviable) than for

the colorless (viable). The results also confirm that the count with vital dye underestimates the number of viable cells by plating. The experiment showed that the count made by human vision directly in the microscope may be replaced by those made on the same images previously captured because the numbers did not differ statistically. It was also found that the lines delimiting the Neubauer chamber disturbs the computer vision system. A new experiment was carried out to adjust the methodology. The viable yeasts were also counted in Petri dishes as in the previous experiment, but the images captured for evaluation by human vision was made in two regions of the Neubauer chamber, a quadrant area with and another without lines. Thereafter all images were subjected to computer vision techniques. This time the counts obtained by the "software" were significantly correlated with the values of counts obtained on the plates and the human eye, showing the potential of automating the viable yeast cells evaluation in distilleries, by using images captured directly after staining with vital dye blue methylene.

Keywords: Auto-mation. Computer vision. Ethanol. Innovation, Viable yeast.

1- INTRODUÇÃO

A indústria de cana-de-açúcar é de longa data um dos estalotes da economia brasileira. A partir da introdução das primeiras mudas no país em 1532, por mais de dois séculos o açúcar foi o principal produto brasileiro. Há cerca de 40 anos, teve início a transformação do setor. Além do açúcar, as usinas passaram a ter foco na produção do etanol e, mais recentemente, a atenção voltou-se à bioeletricidade, aos álcoolquímicos e à comercialização de créditos de carbono.

A crescente necessidade de ampliar de modo sustentável o uso de fontes renováveis de energia, para proporcionar maior segurança ao suprimento energético e reduzir os impactos ambientais associados aos combustíveis fósseis, encontra no bioetanol de cana-de-açúcar uma alternativa economicamente viável e com significativo potencial de expansão (BNDES; CGEE; FAO; CEPAL, 2008). Conforme a UNICA (2010), o Brasil é pioneiro no uso do etanol como combustível veicular. O País utilizou etanol em automóveis pela primeira vez na década de 1920, mas foi em 1975 que a indústria ganhou um grande impulso, com a introdução do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), um programa de substituição em larga escala dos combustíveis veiculares, financiado pelo governo como resposta à crise mundial do petróleo. Na atualidade, o sucesso do programa é impulsionado por dois grandes fatores: a mistura obrigatória à gasolina de 20% a 25% de etanol anidro (o etanol virtualmente livre de água) e a expansão da frota de carros “flex fuel”, que utiliza etanol hidratado (com teor de água de 5% em volume).

Entende-se como fundamental o avanço tecnológico, assim como a geração e incorporação de inovações para manter e avançar na competitividade do etanol produzido no Brasil. Macedo (2007) avaliou a situação atual e perspectivas do etanol e destacou, entre os principais avanços tecnológicos ocorridos no setor sucroalcooleiro no período de 1975-2000, a introdução em larga escala de variedades de cana desenvolvidas no Brasil, o desenvolvimento do uso integral da vinhaça na ferti-irrigação, controle biológico das pragas e doenças da cana, desenvolvimento do

sistema de moagem com quatro rolos, tecnologia para operação de fermentações "abertas" de grande porte, aumento na produção de energia elétrica na indústria, otimização do corte, carregamento e transporte da cana, mapeamento do genoma da cana e transformações genéticas, mecanização da colheita, obtenção de excedentes de energia elétrica e venda para a concessionária, avanços em automação industrial, avanços no gerenciamento técnico (agrícola e industrial) e a introdução dos motores "flex-fuel".

Para Abarca (1999) o desenvolvimento tecnológico implementado no setor sucroalcooleiro aconteceu, principalmente, em função das inovações procedentes de outros setores industriais, através dos fornecedores de equipamentos, e constituindo-se, na década de 90, como um processo de inovação incremental, que poderia ser qualificado ainda como inovação fragmentada, na medida em que não atinge o sistema agroindustrial da cana-de-açúcar, de forma integral.

Em agosto de 2010, haviam 432 usinas em operação no país, das quais 251 eram unidades mistas, produtoras tanto de açúcar quanto de etanol e 162 eram destilarias, sendo que todas eram autossuficientes na produção de energia térmica e de eletricidade (ÚNICA, 2010).

Devido à importância socioeconômica da produção de etanol no Brasil e no mundo, tendo em vista a utilização deste produto em indústrias de alimentos e, como fonte combustível ecologicamente correta, estudos visando a obtenção de melhores procedimentos tecnológicos no processo fermentativo tornam-se de fundamental importância. Observa-se que durante a fermentação alcoólica, a presença do álcool etílico ocasiona queda na viabilidade celular (BROWN et al., 1981; RHEINBOLDT et. al., 1987).

Na área específica da fermentação alcoólica e de seu acompanhamento, muito pouco foi feito em automação. O etanol no Brasil é produzido por via fermentativa usando leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. As destilarias alcoólicas brasileiras operam com o sistema de fermentação denominado "Melle-Boinot", nos quais as leveduras são recicladas por fermentações consecutivas (LIMA; AMORIM; BASSO, 2001). O método clássico de contagem de microrganismos viáveis é realizado em placas de Petri contendo meio de cultura e pode levar até 72 horas. Pelo tempo que é necessário para conseguir a contagem, esse método não pode ser usado nas usinas. Em razão deste obstáculo, o método

padronizado e adotado pelas usinas é o método de azul de metileno em câmara de Neubauer, com contagem em microscópio óptico como descrito por Lee; Robinson; Wang (1981). No entanto este método é complicado e demorado e os resultados são subjetivos e dependente do nível do técnico de formação e experiência (SMART et al., 1999).

Na perspectiva de suprir as necessidades da indústria é necessário considerar a automação que possibilita aumentar a velocidade de processamento das informações para tomada de decisões (EID; SCOPINHO, 1998). No Brasil, Corrêa et al. (1990) relatam análise de viabilidade de células em microscópio de fluorescência, no entanto, o método apesar de sensível e simples é oneroso. Na área de visão computacional, Lamprecht; Sabatini; Carpenter (2007) desenvolveram um “software” de código aberto que pode reconhecer as partículas por diferentes atributos das regiões de interesse (ROI), como a morfologia, cor, textura, entre outros.

Embora disponíveis, fica difícil adotar as técnicas citadas em avaliação de viabilidade das leveduras em razão da necessidade de adaptação para a detecção e classificação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Também é preciso levar em consideração que as usinas já investiram em microscópios óticos e dispõem de resultados de anos com o método de corante vital, que não podem ser simplesmente descartados. Por outro lado além do custo e disponibilização de um técnico para essa avaliação, a automação permitiria analisar rapidamente os relatórios produzidos, além de possibilitar um número maior de análises por dorna e unidade de tempo.

Para viabilizar a substituição da visão humana pela computacional, que caracteriza a automação, há necessidade de validar a tecnologia com o método de corante usado nas usinas, mas também com o método clássico de contagem em placas.

Diante do exposto, a pesquisa interdisciplinar teve como objetivo comparar o método usado nas usinas brasileiras com as contagens realizadas por visão computacional, como forma de melhorar o desempenho do acompanhamento da viabilidade de leveduras em imagens digitalizadas, obtidas de lâminas tratadas com corante vital.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CANA-DE-AÇÚCAR

2.1.1. Histórico e caracterização

A cana-de-açúcar é uma gramínea originária da Nova Guiné, cuja importância econômica no Brasil remonta à época da colonização portuguesa (MOZAMBANI et al., 2006).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma cultura perene, podendo produzir por 4 a 6 anos e atingir rendimentos de massa verde superiores a 120 t/ha/ano (TOWNSEND, 2000). Essa cultura perfilha de maneira abundante, na fase inicial do desenvolvimento. Depois de estabelecido como cultura, o autosombreamento induz inibição do perfilhamento e aceleração do crescimento do colmo principal. O crescimento em altura continua até a ocorrência de alguma limitação, tais como de suprimento de água, ocorrência de baixas temperaturas ou ainda devido ao florescimento, sendo este processo indesejável em culturas comerciais (RODRIGUES, 1995).

Segundo Machado (1987) o sistema produtivo dessa cultura da família *Poaceae* é composto por dois subsistemas: a) produção (folhas fotossinteticamente ativas), escoamento e distribuição do produto fotossintetizado e consumo (raízes, colmos, folhas jovens, tecidos meristemáticos e órgãos reprodutores) e b) acúmulo e armazenamento de sacarose (nos colmos), denominada de maturação.

Pelo fato da cana-de-açúcar ser de metabolismo fotossintético C4 ela é considerada altamente eficiente na conversão de energia radiante em energia química, com taxas fotossintéticas calculadas em até 100 mg de CO₂ fixado por dm² de área foliar por hora. A grande capacidade da cana-de-açúcar, para a produção de matéria orgânica, reside na alta taxa de fotossíntese por unidade de superfície de terreno, que é influenciado pelo Índice de Área Foliar (IAF). Além disso, o longo ciclo

de crescimento da planta resulta em elevadas produções de matéria seca (RODRIGUES, 1995).

Pode-se considerar que um colmo normal de cana madura contenha 12,5% de fibra e 88,0 % de caldo. O colmo possui cerca de 25,0 % de partes duras, representadas pelos nós e cascas, e 75,0 % de partes moles, constituídas pelas partes internas dos meritalos (CASTRO; ANDRADE, 2006).

O colmo é a parte morfológica da cultura de interesse comercial, em razão do acúmulo e armazenamento de açúcares industrializável. Fatores como variedade da cultura, idade fisiológica, condições climáticas durante o desenvolvimento e maturação, propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, tipo de cultivo entre outros, influem diretamente na composição química do caldo, sendo o mesmo extremamente variável em função dos fatores mencionados (PARANHOS, 1987; MARQUES; MARQUES; TASSO JÚNIOR, 2001).

As características de composição das variedades comerciais da cana-de-açúcar varia dentro de certos limites conforme apresentado na TABELA 1.

Tabela 1: Composição da cana-de-açúcar

Componentes da cana-de-açúcar	(%) massa da cana-de-açúcar
Água	73,76
Sólidos	24,27
Sólidos solúveis	10-16
Fibra (seca)	11-16

Fonte: adaptado de CHEN - CHOU, 1993.

A produtividade e longevidade da cana são reguladas por diversos fatores, dentre os quais se destacam a variedade escolhida, fertilidade do solo, condições climáticas, práticas culturais, controle de pragas e doenças e método de colheita. A adequação destes fatores de produção é importante para a maximização da produção e longevidade do canavial (TOWNSEND, 2000).

O período da colheita da cana varia de acordo com o regime de chuvas, de modo a tornar possíveis as operações de corte e transporte e permitir o melhor ponto de maturação e acúmulo de açúcares. Na região Centro-Sul do Brasil, com os estados do Sudeste e Centro Oeste a colheita é de abril a dezembro, enquanto que, na Região Nordeste é realizado de agosto a abril. O sistema tradicional de colheita,

ainda utilizado em cerca de 70% das áreas cultivadas com cana-de-açúcar no Brasil, envolve a queima prévia do canavial e o corte manual da cana inteira. Esse procedimento, no entanto, vem sendo aos poucos substituído pela colheita mecanizada da cana crua picada (sem queima), por conta das restrições ambientais às práticas da queima. Com os recentes acordos firmados entre governo e produtores, espera-se que até 2020 toda a cana seja colhida mecanicamente, sem a queima prévia do canavial (BNDES, 2008).

2.1.2. Aspectos econômicos

A cana-de-açúcar apresenta uma larga escala de adaptação sendo cultivada principalmente em regiões situadas entre os paralelos 35.º N e 35 ºS (ALFONSI et al., 1987). No entanto Segato et al. (2006) enfatizam que para a sua adaptação em regiões tropicais o conhecimento de seu ciclo é de suma importância para que a máxima produtividade seja alcançada, pois esse fator está fundamentada na interação entre a planta, o ambiente de produção e o manejo.

O Brasil se destaca como líder mundial com o plantio da cana-de-açúcar. Segundo dados disponibilizados pela Companhia Nacional de Abastecimento-CONAB na safra 2010/2011 com cerca de 8 milhões de hectares de área plantada, a produtividade média foi de 77.798 kg/ha, foram produzidos quase que 625 milhões de toneladas de cana, obtendo assim um aumento de 8,40% em relação á safra anterior. A lavoura de cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil. Pode-se destacar que novas usinas entraram em funcionamento nesta safra sendo 03 (três) em Minas Gerais, 02 (duas) em São Paulo e Goiás e 01 (uma) em Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro (CONAB, 2011).

Em seu trabalho Guimarães; Turetta; Coutinho (2010), indicam que a expansão da cultura da cana-de-açúcar e o desenvolvimento e modernização do setor sucroalcooleiro têm contribuído incontestavelmente para o fortalecimento do agronegócio brasileiro e, conseqüentemente, para o crescimento da economia do País. O território brasileiro com enormes áreas com potencial agrícola e o avanço tecnológico do setor da cana, têm incentivado o governo brasileiro no direcionamento dos planos governamentais de expansão da cultura da cana-de-açúcar em áreas de pastagens degradadas, principalmente na região centro-oeste

do país.

As regiões de cultivo comercial são Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste, conforme ilustrado na Figura 1.

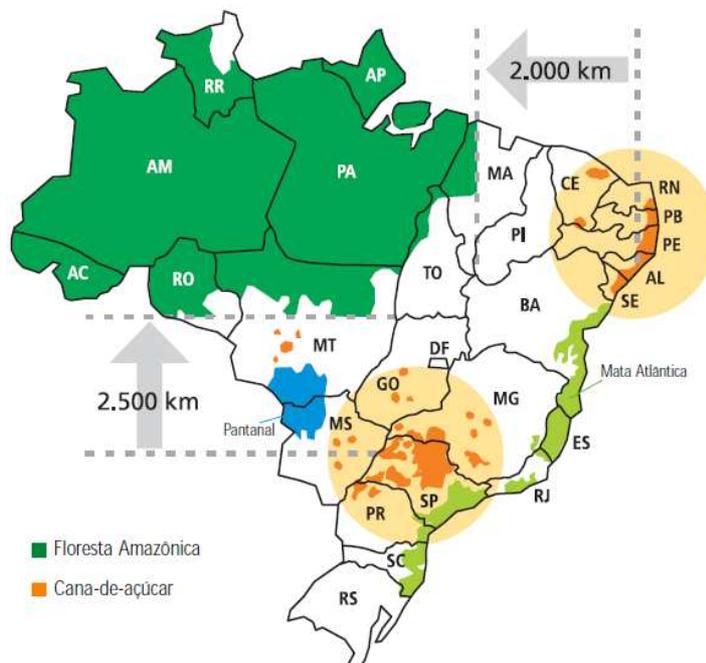


Figura 1- Localização da produção comercial da cana-de-açúcar

Fonte: NIPE-Unicamp, IBGE e CTC

O Estado de Mato Grosso do Sul merece destaque por estar localizado estrategicamente entre mercados potenciais como o MERCOSUL e grandes centros consumidores brasileiros. Além disso, seu potencial de recursos naturais e a infraestrutura moderna voltada para o apoio ao setor produtivo alavancam investimentos no desenvolvimento de atividades agroindustriais e de expansão do intercâmbio comercial (GUIMARÃES; TURETTA; COUTINHO 2010).

Conforme o IBGE (2011), o estado de Mato Grosso do Sul vem atraindo os produtores com terras férteis e mais baratas em comparação às de São Paulo. No biênio 2010/2011 o estado passou do sexto para o quinto lugar no ranking nacional dos estados produtores da cultura, com uma área plantada de 399 mil hectares e produção próxima de 35 milhões de toneladas, um acréscimo de 37% em relação à safra anterior.

A cultura da cana-de-açúcar apresenta grande importância no agronegócio brasileiro, representando a indústria sucroalcooleira cerca de 2% das exportações

nacionais, além de reunir 6% dos empregos agroindustriais brasileiros e contribuir de maneira efetiva para o crescimento do mercado interno de bens de consumo (UNICA, 2011).

Com base em critérios econômicos, ambientais e sociais, a política nacional para a produção da cana-de-açúcar se orienta na expansão sustentável da cultura. Por esse motivo o programa de Zoneamento Agroecológico da Cana-de-Açúcar (ZAEcana) criado pelo governo brasileiro regula o plantio da cultura, levando em consideração o meio ambiente e a aptidão econômica da região. Assim são definidas a partir de um estudo minucioso, as áreas propícias ao plantio com base nos tipos de clima, solo, biomas e necessidades de irrigação (MAPA, 2011).

Com esse zoneamento é esperado que a produção da cana-de-açúcar siga as indicações das legislações ambientais — federais e estaduais — e que seu plantio seja feito de maneira a evitar a competição em áreas de produção de grãos e em áreas com restrições ambientais e antrópicas como bioma Amazônico, Pantanal, áreas de proteção, e áreas indígenas (GUIMARÃES; TURETTA; COUTINHO, 2010).

2.1.3. Caldo de cana

O acúmulo de sacarose no colmo da cana-de-açúcar ocorre quando a produção de açúcar nas folhas excede o consumo energético da planta. Esta produção e consumo são influenciados por diversos fatores como temperatura umidade e outros. Quando as condições se tornam limitantes ao crescimento vegetativo, maior quantidade de sacarose é armazenada e a cana de açúcar entra em maturação (CESAR; SILVA, 1993).

Após a colheita os colmos da cana são transportados do campo para a unidade de processamento. Na usina, os colmos são encaminhados para a etapa de preparo que tem a função de cortar, dilacerar e desfibrar os colmos da cana, rompendo os tecidos para liberação do caldo nelas contidas.

O colmo da planta da cana constitui um sistema de duas fases: sólida e líquida. A fase sólida é um complexo composto de celulose, lignina e pentosanas, conhecida geralmente como fibra. A fase líquida, o caldo, é uma solução aquosa, contendo

uma grande variedade de substâncias orgânicas, que devem ser separadas para a então industrialização (PAYNE, 1989).

Segundo Payne (1989) a extração do caldo da cana consiste no processo físico de separação da fibra (bagaço), sendo feito, fundamentalmente, por meio de dois processos: moagem ou difusão. Pela moagem a separação é realizada em um conjunto de moendas no qual o caldo é expelido da fibra por aplicações sucessivas de pressão à medida que a cana passa entre pares de rolos. Já na difusão a separação entre o caldo e a cana desfibrada se dá por um fluxo contra-corrente de água ao invés de ser expelido por prensagem.

O caldo é constituído de água e dos sólidos solúveis totais, que são classificados em açúcares (sacarose, glicose e frutose) e os não-açúcares. A medida mais utilizada na indústria para controle dos açúcares é o Brix, que pode ser definido com a percentagem peso/peso de sólidos solúveis numa solução impura. Já a medida de Pol expressa a porcentagem de sacarose contida numa solução impura (TORRES, 2007).

O caldo da cana apresenta cor variando, do cinza claro ao verde escuro, apresentando-se como um líquido turvo com muito ar misturado. Além do ar já mencionado, possui em suspensão bagacilho, terra, clorofila e albumina. Sua reação, logo após a extração, é ácida, fracamente nas canas verdes e maduras, porém forte, para aquelas que passaram do seu estado de maturação. Para eliminar as impurezas do caldo, utilizam-se agentes físicos, químicos e físico-químicos, tais como peneiragem, calagem e decantação respectivamente (CASTRO; ANDRADE, 2006).

Araújo (2007) relata que o caldo resultante da cana apresenta coloração escura, proveniente da própria cana. Essa planta contém substâncias como clorofila, antocianina, sacaretina e polifenóis que proporcionam cor ao caldo. Segundo ainda esse mesmo autor, a glicose e a frutose, provenientes da própria composição do caldo, inversão da sacarose do caldo pelo processo de hidrólise, sofrem diversas reações que produzem substâncias escuras que podem ter origem nos sais provenientes do próprio solo ou da adubação.

Segundo Lima et al. (2001), da extração obtém-se o caldo, que por sua vez é constituído de: 78% a 86% de água, sendo que do total de açúcares presentes entre 10% a 20% de sacarose, 0,1% a 2,0% de açúcares redutores, 0,3% a 0,5% de

cinza, 0,5% a 1,0% de compostos nitrogenados e pH entre 5,2 a 6,8.

As características de composição do caldo da cana-de-açúcar são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Composição química do caldo da cana-de-açúcar

Composição do caldo	(%) em sólidos solúveis
Acúcares	75-92
Sacarose	70-88
Glicose	2-4
Frutose	2-4
Sais	3,0-4,5
Ácidos orgânicos	1,5-5,5
Ácidos carboxílicos	1,1-3,0
Aminoácidos	0,5-2,5
Outros não-açúcares orgânicos	
Proteínas	0,5-0,6
Amido	0,001-0,100
Gomas	0,3-0,6
Ceras, gorduras, fosfolipídeos	0,05-0,15

Fonte: adaptado de CHEN- CHOU, 1993

Souza (1988) destaca que a caracterização química do caldo de cana é influenciada por diversos parâmetros como variedade da cana, tipo de solo, adubação, condições climáticas, grau de maturidade da cana, tipo de colheita, tempo entre a queima, corte e o processamento e conteúdo de pontas e palha. Sendo assim, essa diferença na composição do caldo é um dos fatores que afetam as diversas operações unitárias de um processo industrial, em especial a purificação do caldo e, no caso de destilarias, a fermentação alcoólica (CESAR et al., 1987).

2.2. ETANOL

2.2.1. Características

Os alcoóis são compostos que têm grupos hidroxila ligados a átomos de carbono sp^3 . Podem ser vistos como derivados orgânicos da água em que um dos hidrogênios foi substituído por um grupo orgânico. O etanol ($CH_3 CH_2OH$), também chamado álcool etílico, é uma substância orgânica que pode ser obtida da fermentação de açúcares. A fermentação natural dos hidratos de carbono nos caldos de cana, grãos e frutas produz etanol, que é separado das misturas de reação por

meio de destilação fracionada (RUSSEL, 1981).

O etanol com peso molecular 46,07, sob condições ordinárias, é um líquido incolor e claro, volátil, inflamável, possuindo um odor agradável e característico. Suas propriedades físicas e químicas dependem primeiramente do grupo hidroxila, OH^- , o qual imputa polaridade à molécula, além de promover interações intermoleculares via ligações de hidrogênio. Essas duas características ocasionam as diferenças observadas entre os alcoóis de baixo peso molecular e os respectivos hidrocarbonetos. Estudos de espectroscopia no infravermelho mostram que, no estado líquido, as ligações de hidrogênio são formadas pela atração do hidrogênio da hidroxila de uma molécula pelo oxigênio da hidroxila da outra molécula. Tal efeito de associação faz com que o etanol no estado líquido se comporte como um dímero. No estado gasoso, entretanto, ele é um monômero (PEREIRA; ANDRADE, 1998).

2.2.2. Produção de etanol

A produção de bioetanol é efetuada em bases comerciais por duas rotas tecnológicas, utilizando matérias-primas doces, diretamente fermentáveis, como a cana-de-açúcar e a beterraba açucareira, ou matérias-primas amiláceas, como o milho e o trigo, cujo amido deve ser convertido em açúcares (sacarificado) antes da fermentação, como esquematizado na Figura 2. Uma terceira rota, utilizando a biomassa disponível em materiais como o bagaço e a palha, hidrolisa as cadeias celulósicas e produz uma solução fermentável de açúcares (BNDES, 2008).

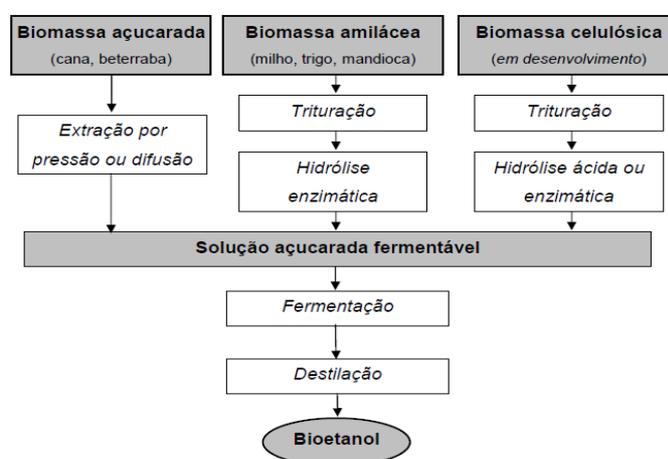


Figura 2- Rotas tecnológicas para produção de etanol
Fonte: BNDES, 2008

A cultura da cana-de-açúcar possui um grande potencial de produção de matéria seca e de energia por unidade de área, e por isso tem se destacado entre as principais gramíneas tropicais para produção de etanol (OLIVEIRA, 2011).

O Brasil produz comercialmente etanol a partir do caldo de cana-de-açúcar. Segundo Alcarde (2011) esse caldo depois de ajustado é denominado nas indústrias de mosto. Para o preparo do mesmo devem ser tomados alguns cuidados no tocante à concentração de açúcares totais e sua relação com sólidos solúveis, acidez total e pH. Em alguns casos pode ser necessária a suplementação de nutrientes e adição de anti-sépticos para se obter rendimentos satisfatórios.

A busca por fontes de energia renováveis e limpas é uma resposta à emissão de gases de efeito-estufa gerados por combustíveis fósseis, que tem efeitos negativos sobre o meio ambiente (MORAES et al., 2010). Neves; Trombim; Consoli, (2010) observam que a cadeia sucroalcooleira já mostrou seu potencial de suprir produtos de maneira sustentável, o que contribui para que o Brasil tenha uma das matrizes energéticas mais limpas do mundo. Estima-se que, em 2015, 80% do combustível consumido no Brasil seja o etanol. Esses mesmos autores lembram que novos produtos, como o etanol celulósico, ou de segunda geração, o diesel a partir de cana e o biobutanol representam importantes fronteiras tecnológicas e já se encontram em fase piloto ou de demonstração e serão importantes fontes de receitas nos próximos anos.

No Brasil, a obtenção de etanol a partir de cana-de-açúcar é efetuada geralmente em unidades agroindustriais mistas que também produzem açúcar. Assim, consegue-se uma boa sinergia entre os dois processos produtivos e os sistemas auxiliares e de utilidades.

A produção de etanol de cana-de-açúcar pode se basear na fermentação tanto do caldo da cana direto quanto de misturas de caldo e melaço, como é mais freqüentemente praticada no Brasil, conforme esquematizado na Figura 3. Da produção de açúcar, resulta o mel final, também chamado de melaço, que não retorna ao processo. No entanto esse subproduto contém ainda alguma sacarose e um elevado teor de açúcares redutores como glicose e frutose, resultantes da decomposição da sacarose, podendo ser utilizado como matéria-prima para a produção do bioetanol mediante diluição e fermentação. No caso de etanol fabricado a partir de caldo direto, as primeiras etapas do processo de fabricação, da recepção

da cana ao tratamento inicial do caldo, são semelhantes ao processo do açúcar. Uma vez tratado, o caldo é misturado com o melaço, dando origem ao mosto. O mosto segue para as dornas de fermentação, onde é adicionada a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e fermentado por um período de 8 a 12 horas, dando origem ao vinho, que é o mosto fermentado, com uma concentração de 7% a 10% de álcool (SEABRA, 2008).

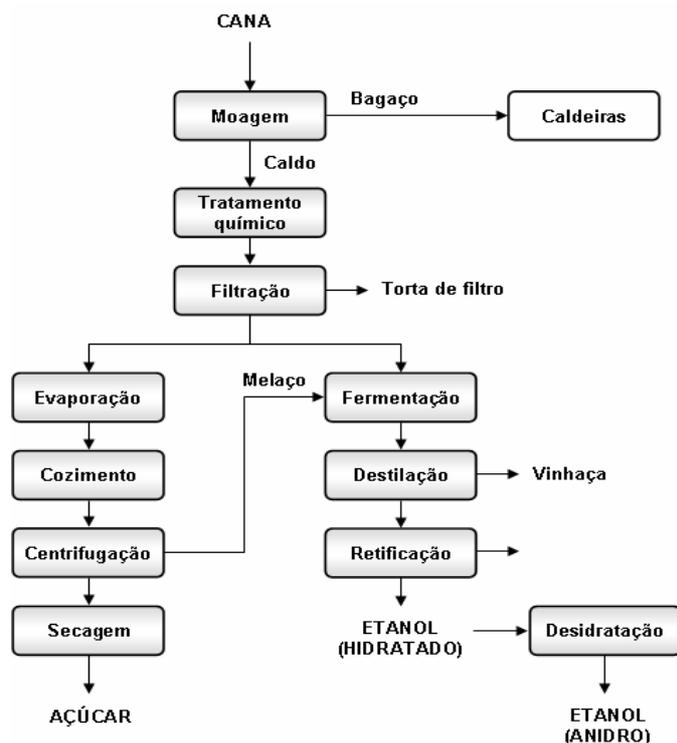


Figura 3- Fluxograma da produção de açúcar e etanol de cana-de-açúcar.
Fonte: Seabra (2008).

As destilarias alcoólicas brasileiras operam com o sistema de fermentação denominado "Melle-Boinot", que consiste na recuperação das leveduras por centrifugação, cujo resíduo é enviado ao novo tanque de tratamento, sendo diluído com aproximadamente mesmo volume de água, seguido da adição de ácido sulfúrico para correção do pH para 2,5 a 3,0 e repouso de 3 horas. Após o tratamento a levedura está pronta para receber novo mosto, sendo assim utilizado durante toda a safra canavieira (LIMA; AMORIM; BASSO, 2001).

Macedo (2005) enfatiza que para uma grande produção industrial de álcool, é essencial maximizar o rendimento alcoólico e reduzir o tempo de fermentação, sendo o processo "Melle-Boinot" um bom meio para atingir este objetivo. Porém alguns fatores como resfriamento das dornas de fermentação, pré-tratamento do

substrato, atividade da levedura e reciclagem da levedura/eficiente separação, devem ser observados para sucesso dessa técnica.

No biênio 2010/2011 do total da produção de cana-de-açúcar, 53,8% foram destinadas à produção de etanol, gerando um volume total de 27.66 bilhões de litros se comparado à safra anterior, ocorrendo um aumento de 7,52% do produto. Já no estado de Mato Grosso do Sul a produção de etanol foi em torno de 1,8 bilhões de litros (CONAB, 2011).

Segundo MAPA (2011) o etanol produzido no Brasil, a partir da cana-de-açúcar também conta com projeções positivas para os próximos anos, devidas principalmente, ao crescimento do consumo interno. A produção projetada para 2019 é de 58,8 bilhões de litros, mais que o dobro da registrada em 2008. O consumo interno está projetado em 50 bilhões de litros e as exportações em 8,8 bilhões.

2.3. Fermentação alcoólica

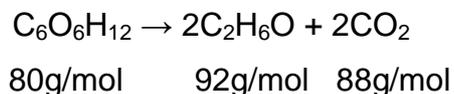
A fermentação alcoólica vem sendo utilizada desde a mais remota antiguidade. Há mais de 4000 anos os egípcios fabricavam o pão e produziam bebidas alcoólicas a partir de cereais e frutas. Entretanto, apenas recentemente é que se pôde relacionar a fermentação com levedura, fungo amplamente distribuído na natureza e com capacidade de sobrevivência tanto em condições aeróbias como anaeróbias (LIMA et al., 2001).

A fermentação alcoólica consiste na atividade enzimática da levedura ou do fermento sobre a matéria-prima açucarada, transformando os açúcares contidos na mesma em álcool etílico ou etanol e anidrido carbônico. Ela é uma das etapas mais importantes em uma destilaria, pois dela depende a eficiência do processo e a qualidade do produto.

Para produção do etanol por via fermentativa destacam-se três fases: o preparo do substrato, a fermentação e a destilação. O preparo do substrato é o tratamento da matéria-prima onde se extrai os açúcares fermentescíveis. A fermentação é a transformação dos açúcares em etanol e dióxido de carbono. Na destilação separa-se o etanol em duas operações. Primeiro separa-se do substrato fermentado ou vinho sob a forma de mistura hidroalcoólica impura com aldeídos,

ésteres, alcoóis superiores e ácidos orgânicos. Na segunda purifica-se e concentra-se o etanol (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

A estequiometria da transformação de açúcares redutores totais em etanol foi representada pela equação de Gay-Lussac sendo:



A fermentação dos mostos realiza-se em três fases: pré-fermentação, fermentação principal e pós-fermentação. A pré-fermentação se inicia quando o fermento que contém as leveduras é adicionado ao mosto devidamente preparado, e caracteriza-se por ativa multiplicação das células e elevação lenta e gradual da temperatura do meio. Após um determinado tempo com presença de pouca espuma, inicia-se a fermentação principal, que é reconhecida pela elevação rápida da temperatura, queda da densidade do mosto por redução dos açúcares e formação equivalente do álcool. A acidez eleva-se abaixando o pH. Essa fase termina quando as espumas desaparecem. A pós-fermentação é caracterizada pela diminuição lenta e gradual da temperatura do mosto, diminuição do desprendimento do gás carbônico e não formação de novas espumas. Essa fase deve durar o mínimo possível para evitar a contaminação do vinho e do pé-de-cuba, que será utilizado em nova fermentação (CECCATO-ANTONINI, 2004).

Como toda a produção comercial de etanol ocorre por via fermentativa a partir de mosto de caldo de cana ou melaço, e considerando que não são utilizados processos esterilizados, é fundamental o conhecimento do processo fermentativo, assim como de seu acompanhamento.

Alcarde e Walder (1997) relatam que todas as etapas do processo de produção de etanol estão sujeitas a contaminação por micro-organismos, principalmente o caldo de cana e o mosto, ambos ótimos substratos para o crescimento de microrganismos. Em especial as bactérias, desenvolvem-se devido ao elevado conteúdo de nutrientes orgânicos e inorgânicos, presença de água, pH favorável e temperatura. Essa contaminação pode ocorrer desde a etapa de cana-de-açúcar no campo, pois nelas há condições favoráveis para o crescimento de toda uma flora microbiana.

Os principais danos causados por esses micro-organismos contaminantes na fermentação alcoólica são: formação de goma, floculação, aumento da acidez do

meio, inibição e queda da viabilidade da levedura devido à excreção de compostos tóxicos (ácidos orgânicos), acarretando a redução no rendimento fermentativo (ALTERTHUM, 1984; YOKOYA, 1991).

Quando a contaminação se instala é importante estabelecer o número de células viáveis e sua proporção com o número de bactérias para fins de tomada de decisão de tratamento ou uso de antibiótico.

O tempo de fermentação alcoólica não deveria ultrapassar de 10 a 12 horas, o que ocorre frequentemente em razão de contaminação com bactérias e leveduras selvagens. O tempo de fermentação varia com o sistema de operação adotado pela indústria. Segundo Amorim (2011) no início do Proálcool, em 1975, os volumes produzidos por unidade industrial aumentaram muito, pois os fermentadores, que antes eram de 50 mil litros e 100 mil litros e passaram a 200, 400, 500 mil litros, 1 milhão, atingiram a capacidade de até 3,5 milhões de litros cada um. Nos primeiros dez anos o rendimento da fermentação que era de 70-75% subiu para 85%, e o tempo de fermentação que antes era entre 16 a 20 horas diminuiu drasticamente para em torno de 10 horas, o que, no início, causou problemas de superaquecimento na fermentação, que depois foram resolvidos.

No caso do etanol proveniente da cana-de-açúcar, a substância final dos processos de destilação e retificação é uma mistura binária etanol- água, que pode ser destinada diretamente ao abastecimento de veículos ou, ainda, sofrer desidratação e originar o álcool anidro, que é utilizado como aditivo da gasolina. O álcool etílico resultante do processamento industrial é uma substância pura, livre de proteínas e de DNA (CIB, 2009)

No Brasil, a eficiência da fermentação industrial já atingiu níveis que serão difíceis de ultrapassar sem inovação tecnológica. A instrumentação e controle de processos, utilização de leveduras flocculantes, e processos com células imobilizadas terão um papel importante nesta evolução tecnológica (VASCONCELOS; LOPES; FRANÇA, 2004).

2.4. Leveduras

Leveduras são micro-organismos cujo crescimento dominante se dá na forma unicelular, não possuem flagelos ou outros órgãos de locomoção. A reprodução é

assexuada por brotamento multilateral e polar ou por fissão, e sexuada por meio de esporos. As características morfológicas das leveduras determinadas por microscopia mostram formas esféricas e ovóides, pêra, cilíndrica e mesmo alongadas em pseudomicélio. Em geral, as células de leveduras são maiores do que das bactérias, mas as menores leveduras não são tão grandes como as maiores bactérias. Esses microrganismos variam consideravelmente, no que se refere às suas dimensões, com limites desde 1 a 5 μ de largura e 5 a 30 μ de comprimento (KONEMAN; ALLEN; JANDA et al., 2001; TORTORA; FUNKE; CASE, 2002).

Cada espécie tem uma forma característica, mas, mesmo em culturas puras, há consideráveis variações de tamanho e de forma das células individuais, dependendo da idade e do ambiente. Apresentam partes visíveis como parede celular, citoplasma, vacúolos, glóbulos de gordura, grânulos e núcleo (CECCATO-ANTONINI, 2000).

Devido à importância econômica dos processos biotecnológicos envolvendo a levedura *Saccharomyces*, na panificação, produção de cerveja, vinho e outras bebidas alcoólicas, querem como no caso no Brasil, na produção de um combustível alternativo e renovável, tal organismo pode ser considerado o eucariótico mais estudado e cujo metabolismo é o mais conhecido entre a espécie (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 2001).

Tendo em vista a importância apresentadas pelas leveduras, as linhagens desses micro-organismos foram sendo selecionadas segundo características desejáveis ao processo e ao produto. A produtividade e a eficiência de fermentação, a tolerância ao etanol e à temperatura, a resistência às altas concentrações de açúcares, a habilidade de flocular e de produzir ou não certos componentes do aroma das bebidas e a propriedade de produzir metabólitos anti-contaminantes são constantes fontes de interesse (HAMMOND, 1995).

Ceccato-Antonini (2004) adverte que além da escolha e da preparação do fermento, algumas condições ótimas devem ser mantidas durante o processo industrial no sentido de obter produtividade máxima de etanol a partir dos açúcares fermentescíveis. Entre os parâmetros a serem considerados, devem figurar, o teor de fermento na dorna, a viabilidade celular, a ocorrência de infecções, o pH, a temperatura e a concentração de açúcares redutores totais no mosto. Há, dessa forma, necessidade de um rigoroso controle do processo de fermentação,

envolvendo a avaliação dos rendimentos práticos e simultaneamente o monitoramento microbiológico.

O estudo da reciclagem das leveduras durante o processo industrial torna-se de vital importância quando da análise dos teores de compostos tóxicos à fermentação, visto que, se eles são produzidos durante o processo e podem acumular-se no inóculo promovendo perdas de viabilidade, abaixando a eficiência e comprometendo a produtividade industrial (OKOLO, 1987).

Além do rendimento industrial, outro ponto a ser considerado na manutenção da viabilidade das leveduras, assim como da qualidade desses micro-organismos é a possibilidade de comercialização para utilização na nutrição de animais.

As leveduras reúnem características favoráveis para seu emprego como complemento nutricional animal principalmente pelo alto conteúdo de nutrientes facilmente assimilados pelo organismo e de alto valor nutricional, sendo um excelente componente alimentar e de rápido crescimento (COPYRIGHT, 2005). Segundo dados da Embrapa (1991), a levedura de destilaria de álcool de cana-de-açúcar é um alimento rico em proteína de alto valor biológico e uma boa fonte de lisina, leucina, treonina, vitaminas do complexo B, carboidratos, lipídios e minerais.

Neves; Trombim; Consoli (2010), descrevem que cerca de 10% das leveduras utilizadas na produção de etanol são posteriormente recuperadas e destinadas à composição de ração animal. Em 2008, o volume exportado de leveduras de cana-de-açúcar foi de 32 mil toneladas, gerando faturamento de US\$ 16,8 milhões. No mercado interno, o faturamento foi de US\$ 11,1 milhões com a venda de 24 mil toneladas de leveduras secas. O maior preço por tonelada do produto no mercado interno deveu-se ao custo logístico e impostos. Juntamente com as leveduras para essa finalidade, são comercializados aditivos baseados em leveduras de cana-de-açúcar (como a parede celular). Em 2008, foram exportadas 13.400 toneladas desse subproduto do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar gerando faturamento de US\$ 25,4 milhões. No mercado interno, foram vendidas 5.000 toneladas desses aditivos, representando faturamento de US\$ 10,3 milhões. Portanto, o faturamento das leveduras somado aos seus aditivos alcançou em 2008 US\$ 63,6 milhões (US\$ 21,4 milhões no mercado interno e US\$ 42,2 milhões no mercado externo).

2.4.1. Contagem de Leveduras

Ceccato-Antonini (2004) explica que a estimativa de células viáveis é importante também para estabelecer a tolerância da levedura ao seu produto de fermentação (etanol), principalmente considerando a eficiência de produção do etanol em fermentações em escala industrial. Também a presença de alcoóis superiores, ácidos graxos e seus ésteres mesmo em baixas concentrações, juntamente com o etanol, agem de maneira sinérgica intoxicando a célula de levedura, causando a morte e conseqüentemente a diminuição da viabilidade celular.

Para estimar a proporção de células viáveis em processo fermentativo, métodos baseados no plaqueamento ou observação microscópica têm sido utilizados. Os métodos de contagem direta no microscópio são rápidos e simples, exigem um mínimo de equipamento, permitindo que seja observada, simultaneamente, a morfologia celular (CECCATO-ANTONINI, 2004).

2.4.1.1. Contagem por plaqueamento

. O método de contagem de micro-organismos em placas é um método geral e versátil que pode ser utilizado tanto para a contagem de grandes grupos microbianos, como aeróbios mesófilos, aeróbios psicrófilos, bolores e leveduras e clostrídios sulfito redutores, como também para a contagem de gêneros e espécies em particular, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*. Variando o tipo de meio (enriquecimento, seletivo, seletivo-diferencial) e as condições de incubação (temperatura e atmosfera), é possível selecionar o grupo, gênero ou espécie que se deseja contar (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

A contagem-padrão em placas determina o número de células viáveis expressa em unidades formadoras de colônias (UFC). Por este método porções de amostras são homogeneizadas, diluídas serialmente em um diluente apropriado, plaqueadas sobre ou dentro de um meio ágar adequado, o qual é incubado sob temperatura apropriada por um determinado tempo, conforme apresentado na Figura 4. Após o tempo estabelecido todas as colônias visíveis são contadas manualmente ou por um contador de colônias eletrônico (JAY, 2005).

Considera-se que cada colônia crescida é proveniente de um micro-organismo viável. A contagem é preferencialmente feita dentro do intervalo de 30 a 300 colônias para uma placa de 9 cm de diâmetro. O fator de diluição e o volume do inóculo são considerados para o cálculo do resultado final (BORZANI, 2001).

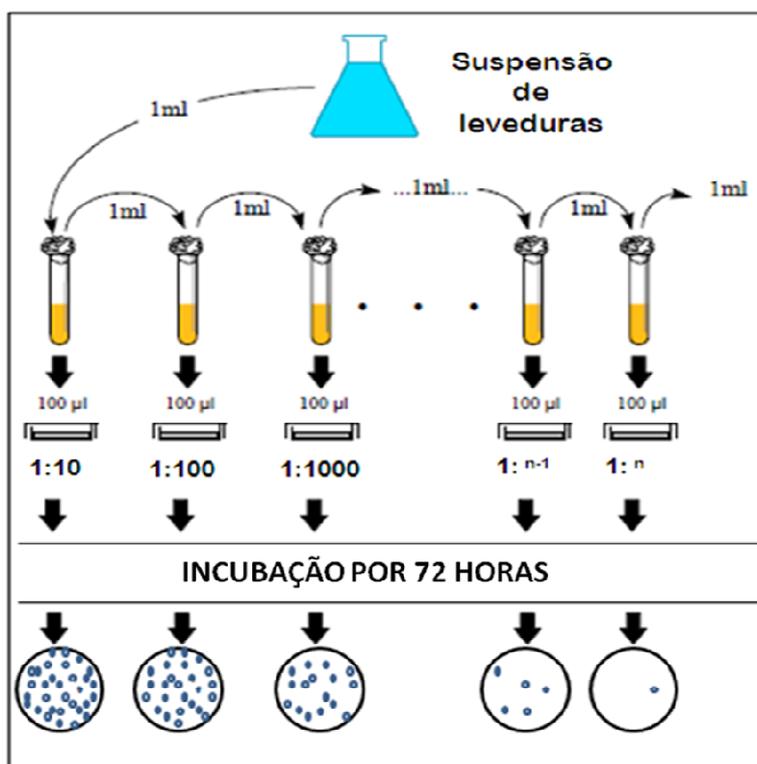


Figura 4: Esquema explicativo do procedimento para execução da técnica de diluições seriada e plaqueamento em placas e contagem.
Fonte: adaptado de Romeiro (2002).

O método de microbiologia clássica de contagem de microrganismos viáveis é o da inoculação em placas de Petri contendo meio de cultura adequado com incubação por um período de até 72 horas, tempo que é necessário para conseguir contagem mais precisa, mas em razão do tempo necessário para a leitura, esse método não é usado nas usinas.

Em razão deste obstáculo, o método padronizado e adotado pelas usinas é o descrito por Lee; Robinson; Wang (1981) que utiliza azul de metileno como corante seguido de contagem em câmara de Neubauer, usando um microscópio óptico, em aumento de 400X.

2.4.1.2. Contagem pela câmara de Neubauer

A Câmara de Neubauer consiste de uma lâmina de microscopia, bem mais alta do que uma lâmina normal, onde existe uma câmara gravada no vidro (as duas partes indicadas por setas no centro da Figura 5 – cada lâmina contém geralmente duas câmaras). Ao lado da câmara existem dois suportes (as duas barras cinza-claras ao lado da câmara na Figura 5) que mantêm uma lamínula especial de quartzo exatamente a 10^{-1} mm acima da base da câmara. Portanto, quando se coloca uma solução na câmara e se cobre a mesma com a lamínula, a profundidade da solução é conhecida (LUCARINI; SILVA; BIANCHI, 2004).

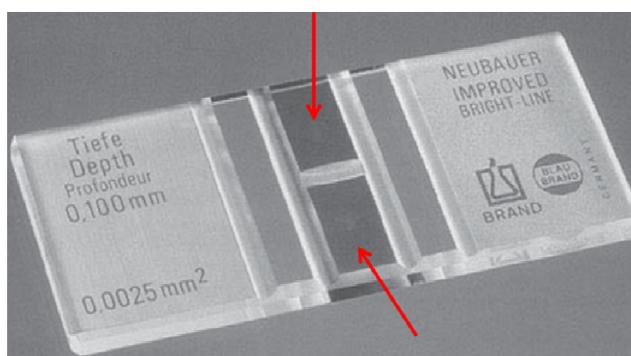


Figura 5- Câmara de Neubauer

No centro desta lâmina existem várias linhas perpendiculares com marcações em quadrantes. Ao analisar em microscópico com aumento de 100x, pode-se perceber que existem três tipos de quadrantes, conforme ilustrado na Figura 6A, que juntos formam um quadrado maior. No caso de contagem de leveduras os quadrantes utilizados são os que estão dentro do círculo, de acordo apresentado na Figura 6B. Em lâminas padrão esses quadrantes centrais totalizam 25. Cada quadrante é composto por 16 retículos, como mostrado na Figura 6C. Estes quadrantes são utilizados para fazer as contagens e assim determinar a concentração de células em um determinado volume de amostra, e deste modo calcular a concentração total de células de leveduras.

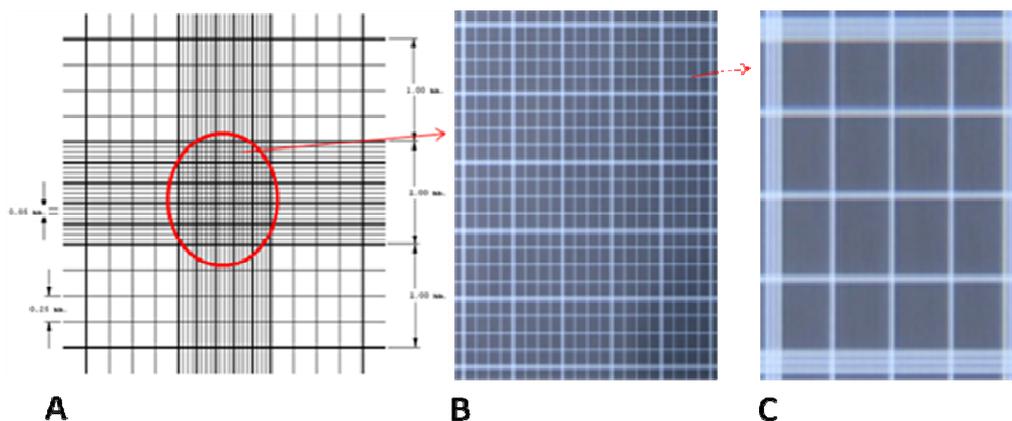


Figura 6- Esquema do quadrante e retículos da Câmara de Neubauer

A técnica de coloração com azul de metileno consiste na mistura de partes iguais da suspensão de leveduras, se necessário diluída, e da solução corante azul de metileno. As células com alta atividade fisiológica não se colorem enquanto que as células inativas apresentam-se coloridas de azul. A porcentagem ou o número de células viáveis é determinado transferindo-se com uma pipeta de Pasteur a amostra para câmara de Neubauer (CECCATO-ANTONINI, 2004).

Na literatura existem poucos trabalhos realizados com comparação entre métodos de contagens.

Os resultados apresentados por Castro; Cereda; Brasil (1982) que compararam a contagem de leveduras viáveis por plaqueamento em Agar Batata com o de corante vital, usando azul de metileno e eritrosina, em laboratório, com levedura comercial, indicaram que havia correlação entre o método de plaqueamento e as contagens pelos dois corantes, pois não diferiram entre si. Segundo esses autores a seleção do corante seria apenas uma questão de acuidade visual e preferência pessoal.

Trevors et al. (1983), em trabalho com quatro linhagens de *Saccharomyces* cultivadas em meio MYGP (extrato de malte, peptona e glicose) e incubadas a 25 °C, utilizando oito métodos para a contagem de células, relatam que a contagem de células de levedura com o corante azul de metileno em câmara de Neubauer proporcionou correlação aceitável, comparando-se com a técnica padrão de contagem em placa. Portanto esses mesmos autores destacam que dependendo do objetivo da utilização desses microrganismos principalmente em fermentações em escala industrial pode ser necessário usar uma técnica de contagem diferente para as espécies ou variedades.

Logo Koch et al. (1986) advertem que a contagem de células de levedura pela câmara de Neubauer em níveis mais baixos de contagens, apresenta falta de precisão.

Apesar da importância desta análise, ela tem sido feita de forma manual e demorada que causa cansaço visual, podendo levar à imprecisão, e ainda exige um técnico treinado. Entretanto essa técnica apresenta baixo rendimento e sujeito à interferência por acuidade visual.

O rendimento das usinas na produção do etanol pode ser incrementado de forma considerável, com o incremento de um sistema para a contagem automática de células de leveduras viáveis e inviáveis em imagens microscópicas digitalizadas.

2.4.1.3. Contagem automatizada

A automação já alcançou alguns setores da microbiologia aplicada. São disponíveis no mercado equipamentos que possibilitam a contagem de células de leveduras de forma automática, tais como o ¹*Nucleo Counter*® YC-100™ da empresa Chemometec da Dinamarca. O equipamento consta de um microscópio de fluorescência integrada, projetado para detectar sinais do corante fluorescente, iodeto de propídio que se liga ao DNA da levedura. Quando entra em contato com as células o iodeto de propídio é dissolvido e o DNA celular é corado. Outro equipamento disponível é o ²*Vi-CELL* um analisador de viabilidade celular fabricada por Beckman Coulter, situada nos Estados Unidos. O *Vi-CELL* realiza automaticamente a contagem utilizando o corante azul de tripan, utilizando uma célula de fluxo contínuo e um sistema de análise de imagem. Um terceiro equipamento o ³*Nalco Yeast Activity Monitor*, fabricado pela empresa americana National Aluminate Corporation, este equipamento extrai sua energia de reação, através da reação entre enzimas da levedura e das moléculas de emissão bioquímica. O equipamento é dotado de uma sonda que é colocada em contato diretamente com a amostra preparada, proporcionando as taxas de atividade metabólica das leveduras.

¹ <http://www.chemometec.com/en-GB/Products/NucleoCounter-YC-100.aspx>

² <http://www.micronal.com.br/produtos/repres/Vi-Cell>

³ <http://www.nalco.com/applications/yeast-activity-monitor.htm>

Corrêa et al. (1990) realizaram a análise de viabilidade de células fúngicas em amostras coradas com solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio, posteriormente examinadas em microscópio de fluorescência. Os autores concluíram que o tempo de coloração ideal foi de 30 minutos para que houvesse a perfeita diferenciação entre células viáveis e não viáveis, no entanto, o método é oneroso, apesar de se mostrar sensível e simples.

A automação na análise de amostras biológicas foi tema do trabalho de Lamprecht; Sabatini; Carpenter (2007) que desenvolveram um software de código aberto que pode reconhecer as partículas por diferentes atributos das regiões de interesse (ROI), tais como a morfologia, cor, textura, entre outros, com diferentes técnicas de visão computacional.

Sharma et al., (2009) desenvolveram tecnologia para aplicações laboratoriais na área farmacêutica, que permitem a detecção e reconhecimento de microorganismo dentro de fluidos.

2.5. Visão computacional

O objetivo da visão computacional é automatizar a tomada de decisões úteis sobre objetos físicos e cenas reais com base em imagens detectadas (SHAPIRO; STOCKAMN, 2001). Segundo Yang e Gillies (2008) visão é exatamente o oposto da computação gráfica. Os processos em computação gráfica iniciam com uma descrição funcional, e terminam com uma imagem de representação. Neste caso, a imagem possui as informações completas, assim, a maior parte dos problemas é de natureza algorítmica. Na visão não se tem a informação completa. Conseqüentemente deve ser usado o domínio específico de conhecimento, suposições ou heurísticas para alcançar o objetivo.

Para determinados problemas, todas as etapas da visão computacional são aplicadas em seqüências, porém essa não é uma regra para cada tipo de aplicação. Embora os conceitos mencionados na Figura 7 estejam apresentados em seqüências e relacionados, eles são independentes.

De acordo com Weeks (1996) uma seqüência de ações para aquisição e processamento de uma imagem pode ser expressa conforme a representação

genérica da Figura 7, onde são representadas as principais operações realizadas no tratamento de uma imagem.

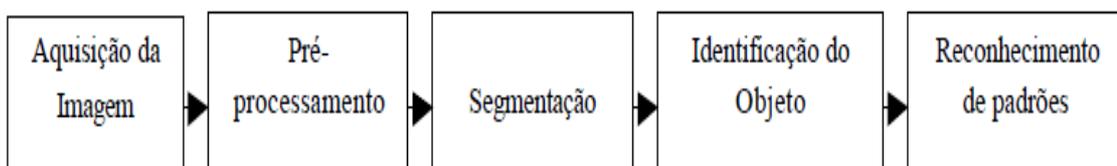


Figura 7: Sequência de ações para aquisição e processamento de uma imagem.

A seguir apresenta-se uma descrição destes conceitos:

- a) **Aquisição da Imagem:** No procedimento de aquisição da imagem, existem dois elementos relevantes que fazem parte de um sistema de visão computacional. O primeiro se refere aos equipamentos que compõem o ambiente (*hardware*), tais como câmeras, computadores e sistemas de iluminação. E o segundo elemento é o programa (*software*) que processa as imagens e gerencia as ações a serem realizadas. Um sistema de aquisição de imagem consiste usualmente de uma câmera CCD (*Charge Coupled Device*) (WEEKS, 1996; RUSS, 1995) um monitor de vídeo e a placa digitalizadora de vídeo (ORTH, 1998)
- b) **Pré-Processamento:** Depois de digitalizar e armazenar a imagem em um computador, as técnicas de pré-processamento são usadas para aprimorar a qualidade de uma imagem, corrigindo iluminação, contraste, distorções e nitidez (RUSS, 1995).
- c) **Segmentação:** é a transformação da imagem em uma escala reduzida de informações. A idéia utilizada na segmentação (*thresholding*) é dividir a imagem em regiões que correspondem a unidades estruturais da cena (RUSS, 1995; RUDEK, 1999; LIU, 2000) ou que distinguem os objetos de interesse (RUSS, 1995) separando os objetos da imagem (*foreground*) das informações de fundo da imagem (*background*).
- d) **Identificação de Objetos:** a identificação e extração de objetos de imagens são necessárias em muitos casos. Devido a uma variedade de razões, os dados de imagens usados na entrada de um sistema de visão, nem sempre são perfeitos. Os problemas que freqüentemente ocorrem estão relacionados com a oclusão, onde um objeto pode estar parcialmente escondido atrás de outro objeto, ou dois.

e) **Reconhecimento de Padrões:** o processamento da imagem é realizado por ambientes computacionais que conseguem operar com as informações obtidas das imagens. A extração de atributos, a exemplo da detecção de borda (LIU; WANG; RAMIREZ, 2000; WONG; CAELLI; GUAN, 2000) constitui-se numa operação que permite definir quais elementos dos objetos nas imagens e podem ser separados de outros objetos presentes na mesma imagem.

As novas tecnologias de visão computacional e processamento de imagens têm sido utilizados com sucesso em muitas aplicações relevantes, principalmente nas áreas da astronomia, medicina, análise de impressões digitais, sensoriamento remoto, multimídia, entretenimento, reconhecimento de assinaturas, manufatura, robótica de manipuladores, robótica móvel, sistemas produtivos, entre outras (RUDEK, 1999).

Pazotti; Person; Bruno, (2006) utilizavam um sistema para automatizar a identificação dos ascósporos existentes nas imagens adquiridas dos discos de coleta, aplicando-se técnicas de visão computacional e de reconhecimento de padrão. O principal objetivo desse sistema é automatizar a identificação dos ascósporos, o qual permite informar ao produtor a existência dos esporos do fungo no pomar e proceder, se necessário, ao seu tratamento.

Sirisathitkul et al. (2006) propuseram um sistema de visão computacional que pode analisar a cor da superfície de laranjas Chokun de suas imagens. Este sistema consiste de uma câmera CCD de cores para a aquisição de imagens e um computador para processamento. O método proposto foi implementado usando o Borland C++ Builder 6.0 em um processador Intel Pentium M 1.7 GHz Notebook com 512 MB de RAM. Noventa laranjas Chokun em três graus de maturação (matérias-primas, maduro e passado) foram usadas na etapa de treinamento e mais 50 laranjas Chokun foram avaliadas na etapa de testes. Primeiramente, a imagem da cor original “Red, Green, Blue” (RGB) de cada laranja foram capturada e transformada em uma imagem HSI⁴. A partir das imagens, as cores de matiz foram

⁴O modelo de cores HSI separa a componente intensidade da informação de cor e saturação. Por ser um modelo mais natural e intuitivo para a percepção humana o modelo HSI é ideal para o desenvolvimento de algoritmos de processamento de imagens baseados na descrição de cores.

analisadas, coletadas e utilizadas para formar regras de decisão de um classificador. Modelo de cores HSI foi usado e regras de decisão são obtidas a partir da cor matiz.

Laurent; Ousmam; Dzudie, (2010) em trabalho realizado com feijão vermelho definiram e determinaram os parâmetros característicos de uma imagem de cor digital de uma semente, identificaram quais desses parâmetros variam significativamente nas condições de armazenamento que predominam em regiões tropicais, para estabelecer correlação entre esses parâmetros e a capacidade de absorção de água por processamento de imagens.

Oliveira; Cavalin; Brito, (2008) propuseram um sistema baseado em visão computacional para detectar defeitos em madeira de Pinus. Era necessário que ao mesmo tempo esse sistema fosse robusto e de baixo custo. Desta forma, um dos desafios da pesquisa foi à seleção de um conjunto de características para detecção de defeitos em madeira, que pudessem ser extraídos de imagens em escala de cinza.

Tellaeche et al. (2007) conduziram estudo de utilização automática do computador, baseado em visão computacional, para a detecção e diferencial de pulverização de plantas daninhas na cultura do milho, utilizando para isso técnicas de agricultura de precisão. A estratégia da proposta envolveu dois processos: segmentação e tomada de decisão.

3-REFERÊNCIAS

ABARCA, C.D.G. **Inovações tecnológicas na agroindústria da cana-de-açúcar**. 1999. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/http ENEGEP1999_A0105_00fxgg417302wyi80soht9h4yxjyhn.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/http%20ENEGEP1999_A0105_00fxgg417302wyi80soht9h4yxjyhn.pdf)>. Acesso em 28 de Outubro de 2011.

ALCARDE, A.R. **Fermentação**. Agencia de informação –EMBRAPA. Disponível em http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-açúcar/CONTAG01_105_22122006154841.html. Acesso em 31 de Outubro de 2011.

ALCARDE, A.R.; WALDER, J. M. M. Efeito da radiação gama na sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa M-300-A) em mosto de mel de cana-de-açúcar. **Sciencia Agricola**, v.54, n.3, p.203-208, 1997.

ALTERTHUM, F. Efeito dos microorganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Campinas, v.3, n.1, p. 42-49, 1984.

AMORIM, H. V. de. O avanço da fermentação. **Revista opiniões**. Ribeirão Preto-SP. p. 40-42, Jan-Mar, 2011.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotecnologia: Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação**. São Paulo: Edgarg Blücher, v. 5., p. 1-43, 2001.

ALFONSI, R.R. PEDRO JÚNIOR, M.J. BRUNINI, O; BARBIERI, V. **Condições climáticas para a cana-de-açúcar**. In: PARANHOS, S.B. (Coord). Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas, fundação Cargill, v.1, p.42-55, 1987.

ARAÚJO, F.A.D. de. Processo de clarificação do caldo de cana pelo método da bicarbonatação. **Revista Ciências & Tecnologia**. Ano 1, n. 1, julho-dezembro 2007

BNDES. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento**

sustentável. Resumo executivo, BNDES, CGEE, FAO e CEPAL / organização BNDES e CGEE. – Rio de Janeiro : BNDES, 316 p, 2008.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos.** São Paulo: Ed. Edgard Blucher LTDA vol. 1, 2001.

BROWN, S.W.; OLIVER, S.G.; HARRISON, D.E.F.; RIGHELATO, R.C. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: differences in the magnitude and complexity of the effect. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 11, p. 151-155, 1981.

CASTRO, S.B. de; ANDRADE, S.A.C. Engenharia e tecnologia açucareira. Departamento Engenharia Química, CTG – UFPE 2006.

CASTRO, M.I.F.de; CEREDA, M.P. e BRASIL, M.A.M. Comparação entre métodos de contagem de células viáveis de leveduras em fermentação alcoólica. In: SIMPOSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 5, Viçosa, 1982. **Anais ...Viçosa**, 1982.

CECCATO - ANTONINI, S.R. Guia prático de microbiologia. Araras: UFSCar, 1996. p.58. (Apostila).

CECCATO-ANTONINI, S.R., SILVA, D.F. Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB**, Piracicaba, v.18, n.4, p.40-46, 2000.

CECATTO-ANTONINI, S.R. Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de Destilaria. In: Curso de treinamento ministrado a unidades pertencentes à usina de açúcar Santa Teresinha, Iguatemi, 2004. p.33.

CESAR, M.A. et al. Capacidade de fosfatos naturais e artificiais em elevar o teor de fósforo no caldo de cana-de-açúcar (cana-planta), visando o processo industrial. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v.5, n. 5, p. 32-38, 1987.

CESAR, M.A.A.; SILVA, F.C.A cana-de-açúcar como matéria prima para a indústria sucroalcooleira. ESALQ. Piracicaba-SP. 1993.

CIB- Conselho de Informações sobre Biotecnologia. **Guia da cana-de-açúcar: avanço científico beneficia o país**, 2009. Disponível em <

http://www.cib.org.br/pdf/guia_cana.pdf>. Acesso em 21 de Outubro de 2011.

CONAB/Companhia Nacional de Abastecimento. Cana-de-açúcar, Safra 2010/2011 – terceiro levantamento, Janeiro/2011. Brasília: Conab, 2011. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_09_14_50_boletim_cana_3o_lev_safra_2010_2011.pdf>. Acesso em 26 de Outubro de 2011.

COPYRIGHT, Glucos Internacional- **A levedura da cana**. Manual Técnico, 1-2 p, 2005.

CORRÊA, B. et al. Método fluorescente (diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) para o estudo da viabilidade de *Cryptococcus neoformans* em liquor. **Ver. Inst. Med. Trop.** São Paulo v. 32, p.46-50, 1990.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (Concórdia, SC). Tabela de composição química e valores energéticos de alimentos para suínos e aves. 3 ed. Concórdia, 1991. 97p.

EID, F.; SCOPINHO, R.A. (coord.). Reestruturação produtiva, política industrial e contratação coletiva nos anos noventa: as propostas dos trabalhadores. Agroindústria da cana-de-açúcar Projeta de Pesquisa e Formação Sindical, GEP-SUCRO, São Carlos. 1998.

GUIMARÃES, L.T.; TURETTA, A.P.D.; COUTINHO, H.L.C. da. Uma proposta para avaliar a sustentabilidade da expansão do cultivo da cana-de-açúcar no estado do Mato Grosso do Sul. **Sociedade e Natureza**, Uberlândia, 22 (2): 313-327, 2010

IBGE. Levantamento Sistemático Produção Agrícola. Rio de Janeiro v.24 n.08 p.1-82 Ago., 2011.

IBGE - Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201108.pdf Agosto de 2011>. Acesso em 26 de Outubro de 2011.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed. RS: Artmed, p. 199-201, 2005.

KOCH, A.H.; BANDLER ,R.; GIBSON, R.R. Fluorescence Microscopy Procedure for Quantitation of Yeasts in Beverages. **Applied and Environmental Microbiology**, vol.5, n.3, p.599-60, 1986.

HAMMOND, J.R.M. Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century. Progress to date. **Yeast**, v.11, n.16, p.1613-1627, 1995.

LAMPRECHT M.R.; SABATINI D.M.; CARPENTER A.E. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. **BioTechniques**, v. 42, pp. 71-75, 2007.

LAURENT, B., OUSMAN, B., DZUDIE, T. et al. Digital camera images processing of hard-to-cook Beans. **Journal of Engineering and Technology Research** Vol. 2(9), pp. 177-188, 2010.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. de. **Produção de etanol**. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.;SCHIMIDELL, W. Biotecnologia industrial. São Paulo: Editora Edgard Blucher, v.3, cap. 1, p.1-39, 2001.

LIMA, U. de A. et al. **Produção de etanol**. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. de A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, cap. 1. (Série Biotecnologia Industrial).

LUCARINI, A.C.; SILVA, L.A. da; BIANCHI, R.A.C. Um sistema para contagem semi-automática de microorganismos. **Revista pesquisa e tecnologia FEI**, São Bernardo do Campo, v. 26, p. 36-40, 2004.

MACEDO,R.S. Fatores importantes na seleção de equipamentos. **Revista opiniões**. 006-18. Out-Dez 2005.

LEE, S.S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, n.11, p.641-649, 1981.

LIU, X.; WANG, D.; RAMIREZ, J.R. Boundary detection by contextual non-linear smoothing. **Pattern Recognition**, vol. 33, p.263-280, 2000.

MACEDO, I.C.. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos avançados**. São Paulo, v. 21, n. 59, 2007.

MACHADO, E.C. **Fisiologia da produção de cana-de-açúcar**. In: Paranhos, S.B. (coord.) Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas, Fundação Cargil, 1987, V.1, p.431.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cana-de-açúcar**. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-açúcar>>. Acesso em 31 de Outubro de 2011.

MARQUES, M.O.; MARQUES, T.A.; TASSO JÚNIOR, L.C. **Tecnologia do Açúcar. Produção e Industrialização da Cana-de-açúcar**. Jaboticabal, Funep, 2001. 166p.

MORAES, M.A.F.D.M. de, COSTA, C.C. da, GUILHOTO, J.J.M., SOUZA, L.G.A. de. OLIVEIRA, F.C.R. de. **Externalidades sociais dos combustíveis**. In: Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética / [coordenação e organização Eduardo L. Leão de Sousa e Isaias de Carvalho Macedo]. São Paulo: Luc Projetos de Comunicação, 2010.

MOZAMBANI, A.E.; PINTO, A.S.; SEGATO, S.V.; MATTIUZ, F.M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E. NÓBREGA, J.C.M. (org.) Atualização em produção de cana-de-açúcar. Piracicaba: CP 2, 2006. p. 11-18.

NEVES, M.F.; TROMBIM, V.G.; CONSOLI, M. **O mapa sucroenergético do Brasil**. In: Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética / [coordenação e organização Eduardo L. Leão de Sousa e Isaias de Carvalho Macedo]. - São Paulo: Luc Projetos de Comunicação, 2010.

OLIVEIRA, F.M. de. **Avaliação das características agrotecnológicas de duas variedades de cana-de-açúcar influenciadas por diferentes épocas de supressão de irrigação e níveis de adubação**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Estadual de Montes Claros-Unimontes, 2011.

OLIVEIRA, L.E.S.; CAVALIN, P.R.; BRITO, A.S. et al. Inspeção Automática de Defeitos em Madeiras de Pinus usando Visão Computacional. **Rita**, Volume XV, Número 2, 2008.

OKOLO, B.; JOHNSTON, J.R.; BERRY, D.R. Toxicity of ethanol, n-butanol and iso-

amyl alcohol in *Saccharomyces. cerevisiae* when supplied separately and in mixtures. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 9, n. 6, p. 431-434, 1987.

ORTH, A. Development and Implementation of a System for Automatic Recognition of Mechanical Parts in a Flexible Manufacturing Cell. Project RAP. Industrial Automation Laboratory, UFSC. **Congress of the Brazilian Computer Society**, SBC, 1998.

PARANHOS, S. **Cana-de-açúcar cultivado e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.356p.

PAYNE, J.H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**. São Paulo: Nobel: STAB, 1989, 245 p.

PAZOTTI, M.A.;; PERSON, J. D. C., BRUNO, O. M. CITRUSVIS - a computer vision system to combat black spot on citrus. **Orange**, Cordeirópolis, v.27, n.2, P273-286, 2006.

PEREIRA, P.A. P. de; ANDRADE, J.B.F. de. Reatividade e quantificação de metanol e etanol na atmosfera. **Química Nova** . 1998, vol.21, n.6, pp. 744-754.

RHEINBOLDT, P.H.H; LEIMER, K.H.; ROSSEL, C.E.V. Sangria e secagem de levedura de destilaria: processo Copersucar, In: Congresso Nacional da STAB, 4, Olinda, 1987. Anais. São Paulo: STAB, 1987. p. 589-593.

RODRIGUES, J.D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. (Apostila), Botucatu: UNESP, 1995. 100p.

ROMEIRO, R.S. da. Método de diluição em placas para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão, 2002. Universidade federal de Viçosa, Departamento de fitopatologia. Disponível em <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni3.pdf>>. Acesso em 01 de Novembro de 2011.

RUDEK, M. **Uma Proposta Para Indexação e Recuperação Automática de Imagens e Reconhecimento de Cheques Bancários Baseadas no Vetor de Comportamento**. Dissertação de Mestrado, CEFET PR, Curitiba, PR, 1999.

RUSS, J.C. The Image Processing Handbook, 2nd Edition, **CRC**, 1995.

RUSSEL, J. B. **Química Geral**. McGraw-Hill do Brasil, São Paulo, 1981.

SEABRA, J.E A. **Análise de opções tecnológicas para uso integral da biomassa no setor de cana-de-açúcar e suas implicações**. (Tese de Doutorado) Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, 2008,

SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M.; MOZAMBANI, A.E. **Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar**. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E. NÓBREGA, J. C. M. (org.) Atualização em produção de cana-de-açúcar. Piracicaba: CP 2, 2006. p. 19-36.

SHAPIRO, L.; STOCKMAN, G. **Computer vision**. New Jersey: Prentice Hall, 2001.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V., SILVEIRA, N. **Contagem total de microorganismos Mesófilos, Aeróbios Psicrófilos e Bolores e Leveduras em placas**. In: Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. p. 7-29, 1997.

SIRISATHITKUL, Y.; THUMPEN, N.; PUANGTONG, W. Automated Chokun Orange Maturity Sorting by Color Grading. **Walailak J Sci & Tech** 2006; 3(2): 195-205.

SMART, K. et al. Use of Methylene Violet Staining Procedures to Determine Yeast Viability and Vitality. **Am. Soc. Brew. Chem.** 57(1):18-23, 1999.

SOUZA, J. **Estudo da eficiência de alguns polielitrólitos utilizados na clarificação do caldo de cana**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

TELLAECHEA, A.; BURGOS-ARTIZZUB, X.P. PAIARES, G. et al. A vision-based method for weeds identification through the Bayesian decision theory. **Pattern Recognition**. v.41, p.521 – 530.2008.

TORRES, R.C. **Estudo do processo de cristalização de açúcar: modelagem e estratégias de controle**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos. Centro de ciências exatas e Tecnologia. - PPG/EQ.São Carlos_SP, 2007.

TORTORA, G.J. FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827p.

TOWNSEND, C.R. Recomendações técnicas para o cultivo da cana-de-açúcar forrageira em Rondônia. **EMBRAPA-CPAF** Rondônia, RT/21 nov./00, p.2-5, 2000.

TREVORS, J.T.; MERRICK, R.L.; RUSSEL, I. et al. A Comparison of methods for assessing viability. **Biotechnology Letters**, Vol. 5, p.131-134.1983.

ÚNICA. Relatório de Sustentabilidade, 2010. Disponível em <<http://www.unica.com.br/multimedia/publicacao/>>. Acesso em 20 de Outubro de 2011.

ÚNICA. O etanol: combustível limpo e renovável. Disponível em <<http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=11891360-41CC-459C-9A22-191506941834>>. Acesso em 15 de Outubro de 2011.

VASCONCELOS, J.N. de; LOPES, C.E.; FRANÇA F.P. de. Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. Vol. 21, No. 03, pp. 357 - 365, 2004.

WONG, H.; CAELLI, T., GUAN, L., A neural network based model for edge Characterization; **Pattern Recognition**, vol. 33, pp. 427-444, 2000.

WEEKS, ARTHUR R. JR., Fundamentals of Electronic Image Processing, SPIE / IEEE **Series on Imaging Science & Engineering**, IEEE Press, 1996.

YANG, GZ; GILLIES, D.F .Computer Vision, Department of Computing, Imperial College. Disponível em <. www.doc.ic.ac.uk/~gzy. Acesso em 30 de Outubro de 2011.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **Stab: Açúcar Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 9, n. 6, p. 38-39, 1991.

4- OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Validar um programa de computador, baseado em visão computacional, como forma de melhorar o desempenho das usinas no acompanhamento da viabilidade de leveduras em imagens digitalizadas de lâminas tratadas com corante vital, comparando-o com o método usado pelas Usinas (câmara de Neubauer) e método microbiano clássico de contagem em placas.

4.2. Objetivos específicos

Captar e tratar as imagens a serem utilizadas no software para a contagem de células viáveis e não viáveis.

Correlacionar os resultados obtidos com o “software”, a técnica usada nas Usinas e o método microbiano clássico de contagem em placa.

Os artigos a seguir foram elaborados seguindo as normas da Revista SBA- Controle & Automação.

VALIDAÇÃO DE MÉTODO BASEADO EM VISÃO COMPUTACIONAL PARA AUTOMAÇÃO DA CONTAGEM DE VIABILIDADE DE LEVEDURAS EM INDÚSTRIAS ALCOOLEIRAS.

Arnaldo Ibanhe Mongelo*
aimongelo@yahoo.com.br

Marney Pascoli Cereda*
cereda@ucdb.br

Hemerson Pistori⁺
pistori@ucdb.br

Lia Nara Balta Quinta⁺
lianaraq@gmail.com

Diogo Soares da Silva⁺
Diogo.ec.2013@gmail.com

* Centro de Tecnologia e Análise do Agronegócio- CeTeAGRO

Universidade Católica Dom Bosco- UCDB, Av: Tamandaré, 8000, CEP 79117-900, Campo Grande, MS, Brasil

+ Grupo de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Visão Computacional-INOVISÃO

Universidade Católica Dom Bosco- UCDB, Av: Tamandaré, 6000, CEP 79117-900, Campo Grande, MS, Brasil

Resumo: A automação aumenta a velocidade de processamento das informações, com reflexos na produtividade e eficiência do processo produtivo. Este artigo investiga a automação do método de análise de viabilidade de leveduras usado em usinas de álcool com o *software* BioViC e sua validação pela comparação com métodos clássicos. Para isso, uma fermentação foi acompanhada pela contagem de células viáveis e inviáveis. O número de células viáveis foi obtido pelo método padrão de contagem em placas. A avaliação foi feita pelo método tradicionalmente usado nas usinas, com corante azul de metileno em câmara de Neubauer. Ao mesmo tempo as imagens foram captadas em microscópio óptico e submetidas a reconhecimento de padrões com técnicas de visão computacional. A análise estatística do número de células de leveduras

viáveis e inviáveis obtida por visão humana e com BioViC (visão computacional) não diferiu para as amostras com Brix 6 e 3, mas ambas superestimaram a contagem padrão por plaqueamento. Os resultados mostraram que o BioViC contou melhor as leveduras inviáveis (azuis) porque as linhas que formam o retículo da câmara de Neubauer dificultaram a análise das imagens na contagem das células viáveis (incolores). O resultado que mostra a análise feita sobre as imagens captadas apresenta a vantagem da possibilidade de armazenamento dos dados para futura avaliação e destacam o potencial da automação da técnica, desde que a barreira das linhas seja contornada ou a câmara de Neubauer dispensada, o que reduziria o custo da análise.

Palavras Chaves: Visão computacional, inovação, leveduras viáveis, etanol,

automação.

Abstract: Automation increases information processing speed, with gains in production productivity and efficiency. This paper investigates the automation of the method for yeast viability analysis used in the Brazilian distilleries with the software BioViC and its validation in comparison to classical methods. For that, a fermentation was monitored by counting viable and viable cells. The number of viable cells was assessed by the standard plate count. The evaluation was performed by the direct method traditionally used in Brazilians distilleries by using staining with methylene blue dye in a Neubauer chamber. At the same time those images were captured by using an optical microscope and subjected to pattern recognition with computer vision techniques. Statistical analysis of the number of viable and non viable yeast obtained by human vision and by BioViC (computer vision) not differ for Brix 6 and 3, but are overestimated in relation to plating counts. The results showed that the BioViC counted best the viable yeast (blue) because the lines forming the reticulum of chamber Neubauer hampered the analysis of the images in the count of viable cells (colorless). The results shows that the analysis performed on the captured images adds the advantage of the possibility of storing data for future evaluation and highlight the potential of automation technology, since the barrier of lines being

circumvented or Neubauer chamber waived, which would reduce the cost of analysis.

Keywords: Computer vision, innovation, viable yeasts, ethanol, automation.

1 INTRODUÇÃO

Entende-se como fundamental o avanço tecnológico, assim como a geração e incorporação de inovações para manter e aprimorar a competitividade do etanol produzido no Brasil.

Especificamente na área da fermentação alcoólica e de seu acompanhamento, muito pouco foi feito em automação. O etanol no Brasil é produzido por via fermentativa usando leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. As destilarias alcoólicas brasileiras operam com o sistema de fermentação denominado "Melle-Boinot", no qual as leveduras são recicladas em fermentações consecutivas (LIMA *et alii*, 2001).

Durante a fermentação do caldo de cana ou melaço, as leveduras passam por estresses, que comprometem sua viabilidade. Entre esses fatores causadores de estresse estão a presença de contaminantes.

Tanto o caldo de cana quanto o mosto são substratos adequados para o crescimento de micro-organismos em função dos seus teores de nutrientes, alta atividade de água e pH adequado (GALLO e CANHOS, 1991). Todo desenvolvimento de micro-organismos

indesejáveis à fermentação constitui-se em contaminação, fato comum nas usinas devido, principalmente, à falta de assepsia durante o processo e também à carga microbiana que acompanha a matéria-prima até a indústria (CABRINI e GALLO, 1999). Os principais danos causados na fermentação alcoólica por esses contaminantes são a formação de goma, floculação, aumento da acidez do meio, inibição e queda da viabilidade da levedura devido a excreção de compostos tóxicos, acarretando a redução no rendimento fermentativo (ALTERTHUM, 1984; YOKOYA, 1991).

Ceccato-Antonini (2004) ressalta que a estimativa de células viáveis é importante também para estabelecer a tolerância da levedura ao etanol como produto de fermentação, principalmente considerando a eficiência de produção do etanol em fermentações em escala industrial. A presença de alcoóis superiores, ácidos graxos e seus ésteres mesmo em baixas concentrações Também causam estresse às leveduras, e , juntamente com o etanol, agem de maneira sinérgica intoxicando a célula de levedura, levando-a a morte e conseqüentemente diminuindo a viabilidade celular.

O método clássico de contagem de micro-organismos viáveis usa placas de Petri contendo meio de cultura. A contagem em placas é o método padrão para leveduras viáveis, mas não conta as inviáveis, uma vez que baseia-se no fato de que cada célula

microbiana viável irá formar uma colônia visível e isolada quando fixada em um meio de cultura sólido adequado (SILVA *et alii* 1997). Obter uma boa leitura pode levar até 72 horas.

Pelo tempo que é necessário para conseguir a contagem, esse método não é utilizada nas usinas.

O tempo de fermentação varia com o sistema de operação adotado pela indústria. Amorim (2011) salienta que em 1975, no início do Proálcool, o tempo de fermentação durava entre 16 a 20 horas e diminuiu drasticamente para em torno de 10 horas atualmente. Essa redução do tempo do processo no início causou problemas de superaquecimento nas dornas, que posteriormente foram sanados.

Em razão deste obstáculo, o método rápido padronizado e adotado pelas usinas é o método coloração por azul de metileno em câmara de Neubauer, com contagem em microscópio óptico como descrito por (Lee *et alii*, 1981).

A contagem como feita nas usinas é rotineira, demorada, sujeita a erros pela imprecisão da leitura e por problemas de cansaço visual (Smart *et alii*, 1999).

Essas dificuldades podem ser contornadas pela automação com geração de dados em tempo real de forma rápida e precisa.

Na perspectiva de suprir as necessidades da indústria é necessário considerar que a automação possibilita aumentar a velocidade de processamento das informações para

tomada de decisões (EID e SCOPINHO, 1998). No Brasil, Corrêa *et alii* (1990) relatam análise de viabilidade de células em microscópio de fluorescência. No entanto, o método, apesar de sensível e simples é oneroso e perigoso para o operador, pois os corantes utilizados são potencialmente cancerígenos. Na área de visão computacional, Lamprecht *et alii* (2007) desenvolveram um *software* de código aberto que pode reconhecer a morfologia, cor, textura, entre outros, usando diferentes atributos das regiões de interesse (ROI).

Embora disponíveis, fica difícil adotar as técnicas citadas em avaliação de viabilidade das leveduras nas usinas e destilarias autônomas em razão da necessidade de adaptação para a detecção e classificação das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Outro fator a ser considerado é a necessidade de substituir os microscópios óticos já disponíveis nas usinas brasileiras.

Buscando a melhoria e a automação do processo de avaliação de células de leveduras, um *software* foi desenvolvido pelo Grupo de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Visão Computacional (INOVISÃO) da UCDB⁵, denominado BioViC. Esse *software* foi criado baseado em técnicas de visão computacional para o tratamento de imagens microscópicas, com o intuito de contar automaticamente as células de

leveduras em imagens digitalizadas (QUINTA *et alii* 2010).

O acompanhamento da viabilidade celular de forma mais eficiente permitirá ampliar as análises e utilizá-las para melhorar a tomada de decisão e por conseguinte do desempenho do processo fermentativo em destilarias.

O primeiro passo para viabilizar a substituição da visão humana pela computacional, o que caracteriza a automação, é a validação do *software* desenvolvido com a comparação com o método de corante usado nas usinas e com o método clássico de contagem em placas. Assim, a pesquisa de caráter interdisciplinar teve como objetivo avaliar a exatidão dos resultados obtidos com a análise de imagem de células de leveduras digitalizadas de lâminas tratadas com corante vital, usando um microscópio ótico e comparar os resultados com os obtidos pelo método usado nas usinas brasileiras e as contagens em meios de cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa, de caráter multidisciplinar, foi desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Visão Computacional (INOVISÃO) e pelo Grupo de Biotecnologia Aplicada a Agroindústrias da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) MS, onde os ensaios foram realizados.

⁵<http://www.gpec.ucdb.br/inovisao/>

2.1 Extração e coleta do caldo

Para a implantação do experimento foi utilizado caldo extraído de colmos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), da cultivar RB 86 7515 colhidos manualmente e sem queima, cultivada em área experimental no Instituto de Pesquisa São Vicente a 20° 24' 39.20" S e 54° 37' 12.75", no Município de Campo Grande/MS. Após prévia limpeza dos colmos, o caldo foi extraído em moenda elétrica da marca Itu, sendo coletado em frascos plásticos e levado ao laboratório de microbiologia do Centro de Tecnologia e Análise do Agronegócio (CeTeAgro/UCDB) para o ensaio de fermentação .

2.2 A fermentação alcoólica

O teor de sólidos solúveis (Brix) inicial, que avaliou os açúcares fermentescíveis no caldo foi de 24°, medido com refratômetro de campo. O ajuste do mosto a 12 °Brix foi feito com água destilada deixando o pH natural do caldo, de 5,5 (sem ajuste). O mosto foi inoculado com levedura selecionada *Saccharomyces cerevisiae* cepa CAT-1, fornecida pela LNF Latino Americana, na concentração de 10 g/L. Cada ensaio constou de 1,5 litros de mosto inoculado, em triplicata, em recipientes de 2 litros. Os frascos foram incubados a temperatura constante de 26° C em BOD TE-401 de marca TECNAL. Amostras foram previstas para serem feitas quando os valores do Brix atenuasse para a metade do valor inicial e de cada amostragem (6,0; 3,0 e 0,0).

2.3 Avaliação das células de leveduras em microscópio ótico.

Utilizou-se coloração com azul de metileno como descrito por Ceccato-Antonini (1996). Uma alíquota da mistura de amostra e corante foi transferida para a câmara de Neubauer e a avaliação realizada em microscópio óptico com aumento de 400X, dotado de interface para captação de imagem. As células com alta atividade fisiológica não se coram (incolores) enquanto que as células inviáveis são coradas de azul. As mesmas imagens contadas entre 4 retículos padronizados da lâmina foram captadas para avaliação por visão computacional.

2.4 Avaliação e contagem das células de leveduras pelas imagens captadas

As imagens captadas dos campos da lâmina foram transferidas para um laptop e recortadas em sua silhueta usando um programa de editor de imagens "Microsoft Office Picture Manager ©" de maneira que em cada imagem permanecessem somente as leveduras contidas entre os 4 retículos, que foram posteriormente contados através do *software*. Esse procedimento foi adotado para contornar a presença das linhas da câmara de Neubauer que delimitam o retículo e dificultam a tomada de imagens.

2.5 Avaliação das células de leveduras por contagem pelo BioViC

Como as leveduras possuem um padrão de forma, o *software* BioViC desenvolvido pelo Grupo INOVISÃO da UCDB contém um módulo baseado em Visão Computacional foi utilizado para reconhecer a forma das leveduras nas imagens, com aplicação das técnicas de pré-processamento, segmentação e extração de atributos, como descritos nos tópicos a seguir.

2.5.1 Pré-processamento

Consiste em preparar a imagem para a coleta de seus atributos e posterior classificação. Este módulo realça as leveduras, separa as células que podem estar muito próximas e elimina todo o fundo da imagem, deixando somente célula. Este procedimento tem a finalidade de evitar possíveis enganos do classificador com os “ruídos” da imagem ou agrupamentos de leveduras.

2.5.2 Extração de Atributos

Nesta etapa somente as regiões de interesse (ROI), que são as regiões que continuaram na imagem após o pré-processamento, são analisadas. Cada ROI apresenta as informações de cada levedura. Com estas informações (atributos de forma, cor e textura) foi criado um arquivo ARFF (Attribute-relation File Format), que armazena as informações obtidas para a posterior classificação. Para a extração de atributos de forma foi aplicado o algoritmo de K-curvatura definido por Silva e Gonçalves (2007) e *Shape Descriptors*

conforme Queiroz e Pistori (2010). Já para a extração de atributos de cor foram de acordo com o modelo de cor HSB descrito por Quinta e Pistori (2009). Para atributos de textura foram utilizados mapas de iteração.

2.5.3 Classificação das Leveduras

Com o arquivo ARFF gerado, a classificação pode ser realizada, comparando os atributos do conjunto de treinamento com as informações extraídas da imagem a ser testada, decidindo assim a qual classe a levedura pertence, neste caso viável (incolor) ou inviável (azul). Para os experimentos foi utilizado o algoritmo de aprendizagem supervisionada C4.5 de acordo com Quinlan (1996) com os parâmetros *default*, ou seja, com as configurações originais do algoritmos, sem variações de parâmetros.

Foram utilizadas cinco imagens para o treinamento, e em cada uma destas imagens foram extraídas amostras de viável e inviável. Posteriormente 96 imagens foram usadas nos testes que geraram os resultados apresentados.

2.6 Contagem das células viáveis de leveduras por plaqueamento

O plaqueamento foi feito como padrão para estabelecer o número real de células viáveis. As mesmas amostras coletadas para a avaliação por corante foram diluídas em séries decimais em solução salina (0,85%). Volumes de 0,1 mL de cada diluição espalhados com o

auxílio da alça de Drigasly em triplicata nas placas de Petri contendo meio de cultura Extrato de Malte Agar e acrescido de ampicilina (500mg/l) para inibição do crescimento de bactérias. As placas foram incubadas a 30°C por 72 horas e posteriormente contadas (TORTORA; FUNKE; CASE et al., 2002).

2.7 Análise estatística

Os resultados das avaliações de células viáveis e inviáveis (corante vital) e das viáveis por contagem em placa foram calculados em médias que foram submetidas a análise de Variância com teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software SISVAR.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens em placas e avaliações por visão humana e computacional ao longo do processo de fermentação são apresentadas nas Tabelas 01 e 02, ajustadas para o mesmo índice de 10^{11} . Como esperado em uma fermentação o teor de açúcares do mosto caiu a partir de 12 °Brix até 3 °Brix, quando a fermentação foi considerada estabilizada para fins de contagem. À medida que o açúcar foi sendo consumido e o etanol formado, a contagem reduziu, mas as médias não diferiram significativamente.

Tabela 01: Valores médios para as três técnicas de contagens de células de leveduras viáveis e inviáveis, em amostras coletadas de fermentação alcoólica, em °Brix 6 (médias de três repetições).

Método de Contagem	Células Viáveis $10^{11}/L$	Células Inviáveis $10^{11}/L$
Microscópio	1,6195 a	0,3403 a
Imagens	1,6083 a	0,3549 a
BioVIC	0,9292 b	04195 a
Plaqueamento	0,2418 c	-----
Média geral	1,0997	0,3722
CV %	12,57	13,28

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O coeficiente de variação (CV) do experimento variou de 12,57 a 30,60 (Tab. 1 e 2). O maior valor encontrado foi para a contagem de viáveis em Brix 3. Os valores podem refletir uma maior variabilidade dos atributos avaliados.

Observa-se na Tabela 01 (Brix 6) quando o teor de açúcares caiu pela metade a contagem por visão computacional (BioViC) das células viáveis diferiram da contagem pelo plaqueamento e daquelas obtidas por visão humana (microscópio), direta ou sobre imagens previamente captadas (fotos). Para as leveduras consideradas inviáveis (coradas) os três métodos apresentaram a mesma contagem.

O método de contagem por plaqueamento em meio nutritivo baseia-se na premissa de que

cada célula microbiana presente em uma amostra irá formar uma colônia separada e visível, quando fixada em meio de cultura apropriada (TANIWAKI, 2001). Por essa razão não se pode obter valores de células inviáveis, uma vez que células inviáveis não formam colônias. Por essa razão a contagem em placas é considerada como método padrão para leveduras viáveis.

Dos métodos utilizados para as contagens de células de leveduras, os menores valores encontrados foram pelo plaqueamento. Os demais métodos não contam colônias e por isso suas contagens podem superestimar as células viáveis. A literatura relata a imprecisão do uso do corante azul de metileno e o fato que pode superestimar a viabilidade celular de leveduras, principalmente em contagens onde a viabilidade é menor do que 95% (Mochaba, 1999; Land, 2001).

Com a continuação da fermentação, espera-se que as condições tornem-se menos adequadas para as leveduras, por esgotamento dos açúcares ou acúmulo de compostos tóxicos, como o próprio etanol .

Comparando-se a contagem das células de leveduras viáveis em Brix 3 (Tabela 02) obtidas pela visão humana e pelo BioVIC , constata-se que, embora o valor obtido pelo “software” tenha apresentado valores menores de concentração de células viáveis do que as obtidas por visão humana a diferença não foi significativa.

Tabela 02: Valores médios para as três técnicas de contagens de células de leveduras viáveis e inviáveis, em amostras coletadas de fermentação alcoólica, em °Brix 3 (médias de três repetições)

Método de Contagem	Células Viáveis 10 ¹¹ /L	Células Inviáveis 10 ¹¹ /L
Imagens	1,4792 a	0,3750 a
Microscópio	1,4236 a	0,3625 a
BioVIC	0,9694 ab	0,4041 a
Plaqueamento	0,1708 b	-----
Média geral	1,0108	0,3805
CV %	30,60	14,09

*Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados da Tabela 02 reforçam os menores contagens para plaqueamento em relação a avaliação por corante vital azul de metileno e BioViC, como já havia ocorrido com °Brix 6,0, mas foi ainda menores, cerca de 60% da contagem anterior, o que reforça que a fermentação estava em seu estágio final. As avaliações pelos demais métodos não refletiram essa redução. Por isso os resultados obtidos na contagem em placas ainda diferiram dos obtidos por avaliação em visão humana. A grande diferença foi de que nesta etapa da fermentação o *software* BioViC apresentou contagens intermediárias entre as obtidas nas placas e a contagem por imagem ou visão humana, que não diferiram entre si.

McLean *et alii* , (2001) desenvolveram um método de contagem do número de células ativas baseado na atividade metabólica das

celulas de leveduras, quando expostas a agentes químicos que proporcionaram fluorescencia, quantificada em uma bateria portátil de fluorímetro. A contagem obtida pela tecnologia relatada correlacionou-se significativamente com a contagem obtida pela técnica que utiliza azul de metileno em câmara de Neubauer. Na correlação com as contagens pelo método de plaqueamento os indices foram considerados baixos.

Já Trevors *et alii*, (1983) relatam os resultados com quatro linhagens de *Saccharomyces* cultivadas em meio MYGP (extrato de malte, peptona e glicose) e incubadas a 25 °C, utilizando oito métodos para a contagem de células. Os autores relatam que a contagem de células de levedura com o corante azul de metileno em câmara de Neubauer proporcionou correlação aceitável, quando comparada com as obtidas para a técnica padrão de contagem em placa. No entanto esses mesmos autores enfatizam que pode ser necessário usar uma técnica de contagem diferente para as espécies ou variedades de leveduras, dependendo do objetivo da utilização desses microrganismos e, principalmente, em fermentações em escala industrial.

Para as células inviáveis, coradas de azul a avaliação feita por visão humana e computacional não diferiram nas contagens (Tabela 1 e 2), mostrando que neste caso o *software* avaliou melhor as células coradas de azul que as incolores.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram estabelecer maior acerto para leveduras inviáveis em função de atributos de cor, que destacam as leveduras coradas do fundo da imagem. O maior obstáculo entretanto, foi a presença dos retículos, que exigiram uma técnica de recorte das células, que tornou a automação mais difícil e imprecisa. Destaca-se que a análise feita sobre as imagens captadas proporcionou o mesmo nível de acerto que aquele obtido por visão humana diretamente no microscópio ótico, o que possibilita o armazenamento dos dados para futura avaliação sobre as imagens captadas, pelo menos assegurando mais conforto ao analista.

5 REFERÊNCIAS

- Ceccato - Antonini, S.R.(1996). Guia prático de microbiologia. Araras: UFSCar.
- Corrêa, B. et al. Método fluorescente (diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) para o estudo da viabilidade de *Cryptococcus neoformans* em liquor. Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo v. 32, p.46-50, 1990.
- Eid, F.; Scopinho, R.A. (coord.) (1998). Reestruturação produtiva, política industrial e contratação coletiva nos anos noventa: as propostas dos trabalhadores. Agroindústria da cana-de-açúcar Projeto de Pesquisa e Formação Sindical, GEP-SUCRO, São Carlos, SP.
- Lamprecht M.R.; Sabatinl D.M.; Carpenter A.E.(2007). CellProfiler: free, versatile software for automated biological image

- analysis. *BioTechniques*, v. 42, pp. 71-75.
- Lee, S.S.; Robinson, F. M.; Wang, H.Y. (1981). Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, n.11, p.641-649.
- Lima, U. A.; Basso, L.C.; Amorim, H.V. de. Produção de etanol. In: Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.;Schimidell, W. (2001). *Biotecnologia industrial*. São Paulo: Editora Edgard Blucher, v.3, cap. 1, p.1-39.
- Queiroz, J. H. F. de S.; Pistori, H. (2010). Desenvolvimento de um sistema de visão computacional para o monitoramento e controle de experimentos laboratoriais realizados com larvas do aedes aegypti l.(Monografia) Engenharia de Computação na Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande – MS.
- Quinlan, J. R. (1996). Improved use of continuous attributes in C4.5. *Journal of Artificial Intelligence Research*, v. 4, pp.77– 90.
- Quinta, L. N. B.; Pistori H. (2009). Desenvolvimento de um sistema de visão computacional para o controle microbiano em processos de produção de etanol.(Monografia) Engenharia de Computação na Universidade Católica Dom Bosco,Campo Grande - MS .
- QUINTA, L.; QUEIROZ, J.; SOUZA, K. P. de; PISTORI, H.; CEREDA, M. P. Classificação de Leveduras para o Controle Microbiano em Processos de Produção de Etanol. In: WVC 2010 - Workshop de Visão Computacional, 4-7 Julho, Presidente Prudente, São Paulo, 2010
- Silva, N.; Junqueira, V., Silveira, N. (1997). Contagem total de microorganismos Mesófilos, Aeróbios Psicrotrófilos e Bolores e Leveduras em placas. In: Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. pp. 7-29.
- Silva, J. A.; Gonçalves, W. N. (2007). Modelos ocultos de markov aplicados na identificação de comportamento de animais. (Monografia) Engenharia de Computação na Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande – MS.
- Smart K.; Chambers, K.M.; Lambert I.; Jenkins C. 1999. Use of Methylene Violet Staining Procedures to Determine Yeast Viability and Vitality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. V. 57 nº 1, pp18-23.
- Taniwari, M.H.; Silva ,N. Da; Banhe, A.A.; Iamanaka, B.T.; Silva, N. (2001). Comparison of culture media, simplate, and petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. *Journal of Food Protection*, v.64, n.10, pp.1592-1596.
- Tortora, G.J. Funke, B. R., Case, C. L. (2002). *Microbiologia*. Porto Alegre: Artmed, 827p.

PRECISÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURAS COM CORANTE VITAL EM IMAGENS CAPTURADAS EM CAMARA DE NEUBAUER COM USO DO “SOFTWARE” BIOVIC PARA AUTOMAÇÃO.

Arnaldo Ibanhe Mongelo*
aimongelo@yahoo.com.br

Hemerson Pistori⁺
pistori@ucdb.br

Marney Pascoli Cereda*
cereda@ucdb.br

Diogo Soares da Silva⁺
Diogo.ec.2013@gmail.com

* Centro de Tecnologia e Análise do Agronegócio- CeTeAGRO
Universidade Católica Dom Bosco- UCDB, Av: Tamandaré, 8000, CEP 79117-900, Campo Grande, MS, Brasil

+ Grupo de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Visão Computacional-INOVIÃO
Universidade Católica Dom Bosco- UCDB, Av: Tamandaré, 6000, CEP 79117-900, Campo Grande, MS, Brasil

Resumo: O número de células de leveduras viáveis por litro define a velocidade e a rentabilidade da produção de etanol da fermentação alcoólica. O artigo aborda a precisão na automação do método de análise de viabilidade de leveduras que é usado tradicionalmente em destilarias brasileiras. A proposta analisa a substituição da visão humana por imagens capturadas e analisadas automaticamente pelo “software” BioViC, comparada com o método padrão de contagem em placas. A melhoria do desempenho do BioViC na avaliação da contagem de células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação alcoólica possibilitou evitar os problemas causados pelas linhas de demarcação da câmara de Neubauer. Para isso as imagens das amostras do fermentado foram obtidas em duas áreas da lâmina de Neubauer como forma de evitar as linhas de demarcação

existentes. As fotos foram feitas com o mesmo microscópio óptico, dotado de interface para captação de imagens. Essas imagens foram avaliadas por visão humanas nas duas regiões da câmara de Neubauer e posteriormente submetidas às técnicas de visão computacional e reconhecimento de padrões. A análise estatística mostrou que para ambas as amostras, °Brix inicial de 12 e final de 3, o número de células de leveduras viáveis obtidas na análise das imagens por visão humana não diferiram das obtidas diretamente com o BioViC. Em °Brix 6 as contagens superestimaram a contagem padrão por plaqueamento. As contagens obtidas pelo “software” reproduziram os valores de contagem obtida diretamente nas imagens pela visão humana, o que foi demonstrado pela correlação obtida (r^2 0,968). Os resultados mostram a potencialidade de automatizar a avaliação de células viáveis de

leveduras nas destilarias, diretamente em imagens capturadas após coloração com corante vital azul de metileno.

Palavras Chaves: Visão computacional, inovação, leveduras, destilaria, automação.

Abstract: The number of viable yeast cells per liter of an alcoholic fermentation controls the speed and cost of ethanol production. The article discusses the accuracy of the automation of yeast viability analysis which is traditionally used in Brazilian ethanol distilleries. The proposal analyzes the replacement of the human vision by images captured by the "software" BioViC, compared with the standard method of plate counting. The improvement in the performance of viable cells counting of *S. cerevisiae* in alcoholic fermentation by BioViC evaluation avoided the problems caused by the demarcation lines of the Neubauer chamber. The images from each fermentation sample were obtained in two areas of the Neubauer chamber as way of bypass the demarcation lines. The pictures were made by using the same optical microscope, equipped with interface for images capturing. These images were evaluated by human vision in the two regions of the Neubauer chamber and after wares subjected to computer vision and pattern recognition techniques. Statistical analysis showed that the number of viable yeast cells obtained directly from the images by the human vision does not differ from those obtained directed with the

BioViC for both the samples with 12 ° Brix (initial) and third (final). By the other hand at 6 ° Brix both the counting methods overestimated the standard counting by plating. The counts obtained by the "software" reproduced the count values obtained directly from the images by human vision, which was demonstrated by the correlation (r^2 0.968). The results show the potentiality of the automation in the evaluation of viable cells of yeast in distilleries, using images captured directly after staining with vital dye methylene blue.

Keywords: Computer vision, innovation, yeast, distillery, automation.

1 INTRODUÇÃO

A indústria de cana-de-açúcar é de longa data um dos esteios da economia brasileira, mas há cerca de 40 anos, o setor passou a valorizar o etanol combustível, além do açúcar. Mais recentemente a geração de eletricidade, os alcoolquímicos e a comercialização de créditos de carbono passaram a integrar esse agronegócio. Nesse cenário, a introdução de tecnologias no processamento industrial passou a apresentar importância fundamental para o setor por sua capacidade de melhorar o desempenho.

Na melhoria de desempenho e automação destacam-se a produção agrícola e automação industrial segundo relata Macedo (2007) e a cogeração de energia (ESCOBAR, 2003). Na área específica da fermentação alcoólica e de

seu acompanhamento, muito pouco foi feito em automação.

No Brasil, o etanol é produzido por via fermentativa principalmente a partir de caldo de cana, tendo por agente a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (WHEALS *et alii*, 1999). Como processo as destilarias brasileiras operam a fermentação descontínua, denominada "Melle-Boinot", assim como a fermentação contínua, ambos com reciclagem das leveduras em processos consecutivos de fermentação que duram toda a safra canavieira (AMORIM *et alii*, 1985).

O tempo de fermentação varia com o sistema de operação adotado pela indústria. Segundo Amorim (2011) em comparação aos utilizados em 1975, no início do Proálcool, os volumes produzidos por unidade industrial aumentaram muito. Os fermentadores, que antes tinham capacidade para 50 mil e 100 mil litros, evoluíram a 200, 400, 500 mil litros, 1 milhão, chegando à capacidade de até 3,5 milhões de litros cada. Nos primeiros dez anos o rendimento da fermentação que era de 70-75% subiu para 85%, e o tempo de fermentação que antes durava entre 16 a 20 horas, diminuiu drasticamente para em torno de 10 horas. Essa redução do tempo do processo no início causou problemas de superaquecimento nas dornas, que posteriormente foram sanados.

Parte do sucesso alcançado na etapa industrial deve-se às leveduras que foram disponibilizadas. Ceccato-Antonini (2010)

relata que com a técnica de cariotipagem eletroforética para identificação de espécies e linhagens de leveduras, teve início a seleção das primeiras linhagens com habilidade de permanência nos processos industriais, iniciada na década de 1990.

Segundo Hammond (1995) a importância representada pelas leveduras levou à seleção de linhagens para uso comercial, de acordo com as características desejáveis ao processo e ao produto. Passaram a ser considerados pontos de interesse as características como produtividade, eficiência de fermentação, tolerância ao etanol, à temperatura, resistência às altas concentrações de açúcares, a habilidade de flocular e de produzir ou não certos componentes de aroma das bebidas, assim como a propriedade de produzir metabólitos capazes de controlar os contaminantes.

Com isso muitas cepas foram disponibilizadas para as destilarias, mas a determinação do número de células viáveis tornou-se crucial na avaliação deste novo material

Durante a fermentação do caldo de cana ou melaço, as leveduras passam por estresses, que comprometem sua viabilidade.

Entre os fatores causadores de estresse estão a presença de contaminantes.

Todo desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis à fermentação constitui-se em contaminação, fato comum nas usinas devido principalmente à falta de assepsia durante o

processo e também à carga microbiana que acompanha a matéria-prima até a indústria (CABRINI e GALLO, 1999). Tanto o caldo de cana quanto o mosto são substratos adequados para o crescimento de micro-organismos em função dos seus teores de nutrientes, alta atividade de água e pH adequado (GALLO e CANHOS, 1991). Os principais danos causados na fermentação alcoólica por esses contaminantes são a formação de goma, floculação, aumento da acidez do meio, inibição e queda da viabilidade da levedura devido a excreção de compostos tóxicos, acarretando a redução no rendimento fermentativo (ALTERTHUM, 1984; YOKOYA, 1991).

Uma vez que a viabilidade das células de levedura é fator importante da microbiologia industrial, é crucial o estabelecimento do número de células viáveis de leveduras no processo. Em razão da rapidez com que a fermentação alcoólica se desenvolve, há necessidade de selecionar métodos microbianos adequados.

Segundo Ceccato-Antonini (2004) são utilizados métodos baseados no plaqueamento ou observação microscópica para estimar a proporção de células viáveis em processo fermentativo. Os métodos de contagem direta no microscópio são rápidos e simples, exigem um mínimo de equipamento, permitindo que seja observada, simultaneamente, a morfologia celular. Ainda segundo o mesmo autor, a estimativa de células viáveis é

importante também para estabelecer a tolerância da levedura ao etanol como produto de fermentação, principalmente considerando a eficiência de produção do etanol em fermentações em escala industrial. Também causam estresse às leveduras, a presença de alcoóis superiores, ácidos graxos e seus ésteres mesmo em baixas concentrações, juntamente com o etanol, agem de maneira sinérgica intoxicando a célula de levedura, levando-a a morte e conseqüentemente diminuindo a viabilidade celular.

Os corantes vitais são utilizados sobre preparações frescas de micro-organismos sem tratamento prévio, mantendo a vitalidade das células. A finalidade de seu uso é facilitar a observação tornando a célula mais visível. Para garantir que os corantes vitais não sejam tóxicos são usadas soluções muito diluídas, em concentrações da ordem de 1/10.000 a 1/50.000. São citados como mais eficientes os corantes básicos e neutros, tais como o azul de metileno, azul tripan, vermelho neutro, azul do Nilo, vermelho do Congo, azul brilhante de cresilo, verde Janus, castanho de Bismark e "azur e azur II" (NEDER, 1992).

Por outro lado, o método de microbiologia clássico de contagem de micro-organismos viáveis é o da inoculação em placas de Petri contendo meio de cultura adequado, com incubação por um período de até 72 horas, tempo que é necessário para conseguir contagem mais precisa, mas essa necessidade o inviabiliza para os laboratórios

das usinas, uma vez que o tempo de incubação supera o da fermentação alcoólica, a ser considerada a duração citada por Amorim (2011).

Em razão deste obstáculo, o método padronizado e adotado pelas usinas é o descrito por Lee *et alii* (1981) que utiliza azul de metileno como corante vital. A contagem é feita em câmara de Neubauer, usando um microscópio óptico, que proporcione aumento mínimo de 400X.

Lucarini *et alii* (2004) descrevem a Câmara de Neubauer como uma lâmina de microscopia, bem mais alta do que uma lâmina normal, com uma ou duas câmaras gravadas no vidro. Ao lado da câmara existem dois suportes que mantêm uma lamínula especial de quartzo exatamente a 10^{-1} mm acima da base da câmara. Portanto, quando se coloca uma amostra na câmara e se cobre com essa lamínula, a profundidade da solução é conhecida.

Um conjunto completo da câmara de Neubauer consta de nove quadrados, dos quais cada um possuem medidas de 1mm x 1mm. Os 4 quadrados grandes dos cantos marcados com "A" na Figura 1 são divididos em 16 quadrantes com dimensões de 0,25mm x 0,25mm cada. O quadrado médio identificado como "C" é dividido em 25 quadrantes de 0,2mm x 0,2 mm, que por sua vez são subdivididos em 16 quadrantes pequenos de 0,05mm x 0,05 mm. Cada um

destes quadrados corresponde a área de 1 mm² (ROUGE, 2002).

Para obter resultados fidedignos da avaliação de leveduras viáveis (azuis) e inviáveis (incolores) o número de contagens necessárias é elevado e o cansaço e problemas de acuidade visual levam a imprecisão das contagens. Nestas situações, a automação pode proporcionar mais conforto e exatidão.

A visão computacional permite automatizar a tomada de decisões úteis sobre objetos físicos e cenas reais com base em imagens detectadas (SHAPIRO e STOCKAMN, 2001). Russ (1995) salienta que devido a uma variedade de razões, os dados de imagens usados na entrada de um sistema de visão, nem sempre são perfeitos. Os problemas que frequentemente ocorrem estão relacionados com a oclusão, onde um objeto pode estar parcialmente escondido atrás de outro objeto, ou dois.

No caso específico na avaliação de células de micro-organismos a utilização de imagens digitalizadas em um módulo de visão computacional, pode ser afetada por interferências que no caso da fermentação alcoólica pode ser a presença de bactérias, bolhas de ar, sujeiras na amostra ou diferenças muito grande na luminosidade da imagem. Este tipo de interferência pode ser chamado de "ruído". Mongelo *et alii* (2011) em trabalho de validação de método baseado em visão computacional para automação da

contagem de viabilidade de leveduras, relatam que os valores alcançados da avaliação de células de leveduras com corante vital realizadas diretamente no microscópio e aquelas feitas sobre as imagens captadas não diferiram estatisticamente. No entanto, os resultados obtidos permitiram estabelecer maior acerto para leveduras inviáveis em função de atributos de cor e principalmente pela semelhança entre as viáveis, o fundo da imagem e, principalmente, o “ruído” proporcionado pelas linhas de orientação da câmara de Neubauer. Para confirmar essa interferência, as imagens capturadas tiveram de ser “recortadas” em seu contorno de maneira que em cada imagem permanecessem somente as leveduras, eliminando-se dessa forma as linhas que interferiam negativamente na avaliação quando processada pelo *software*. Comprovada essa interferência negativa, o processo se mostrou mais confiável, mas tão demorado quanto à contagem por visão humana.

Para eliminar esse inconveniente a pesquisa teve por objetivo aumentar a precisão e rapidez da contagem de células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação alcoólica utilizando imagens capturadas e análise pelo *software* BioViC, em comparação com o método padrão em placas e pela contagem direta com câmara de Neubauer, como método usado nas usinas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para contornar os problemas identificados, além de especialistas em fermentação alcoólica, participou da pesquisa o grupo de Desenvolvimento e Inovação em Visão Computacional (INOVISÃO) da Universidade Católica de Campo Grande (UCDB), MS, onde os ensaios foram realizados.

2.1 Extração e coleta do caldo

Para a implantação do experimento foram utilizado caldo extraído de colmos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), da cultivar RB 86 7515 colhidos manualmente e sem queima, cultivada em área experimental no Instituto de Pesquisa São Vicente a 20° 24' 39.20" S e 54° 37' 12.75", no Município de Campo Grande/MS. Após prévia limpeza dos colmos, o caldo foi extraído em moenda elétrica da marca Itu, sendo coletado em frascos plásticos e levado ao laboratório de microbiologia da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, para preparo do processo fermentativo.

2.2 A fermentação alcoólica

O teor de açúcares (Brix) no caldo inicial foi de 22°, medido com refratômetro de campo e assim diluído com água. O mosto ajustado em 12 °Brix e pH de 5,5 foi inoculado com levedura selecionada *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, fornecida pela LNF Latino Americana, na concentração de 10 g/L

(FIALHO JUNIOR, 2007). Cada ensaio constou de 1,5 litros de mosto inoculado, em triplicata, em recipientes de 2 litros. Os frascos foram incubados a temperatura constante de 26° C em BOD TE-401 de marca TECNAL. A fermentação foi acompanhada no tempo com amostras retiradas em °Brix 12 (inicial), 6 (intermediário) e 3 (final).

2.3 Contagem das células viáveis de leveduras por plaqueamento

O plaqueamento foi feito como padrão para estabelecer o número real de células viáveis. As mesmas amostras coletadas para a avaliação por corante foram diluídas em séries decimais em solução salina (0,85%). Volumes de 0,1 mL de cada diluição foram espalhados com o auxílio da alça de Drigalsky em placas de Petri contendo meio de cultura Extrato de Malte Agar. As placas foram incubadas a 30°C por 72 horas e posteriormente contadas (TORTORA *et alii*, 2002). As contagens foram expressas em Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por litro.

2.4 Coloração das células de leveduras viáveis por azul de metileno

As amostras coletadas foram coradas com azul de metileno como descrito por Ceccato-Antonini (1996), com mistura de partes iguais da suspensão de levedura (amostra) adequadamente diluída com a solução corante azul de metileno 1% em água destilada. Uma alíquota dessa suspensão foi transferida com

auxílio de pipeta Pasteur para a câmara de Neubauer e coberta com a lamínula apropriada.

2.4.1 Contagem de células viáveis em imagens capturadas da câmara de Neubauer por visão humana.

Amostras da suspensão de leveduras e corante (2.3) foram colocadas sobre a lâmina e recobertas com lamínula de quartzo. A seguir foi examinada em microscópio óptico com aumento de 400X. As imagens capturadas foram obtidas no quadrado médio marcados em “C” na Figura 1, constituindo 25 quadrados, dos quais se obteve uma imagem, totalizando assim 25 imagens. Posteriormente nas imagens captadas foram feitas as avaliações de viabilidade das leveduras por visão humana.

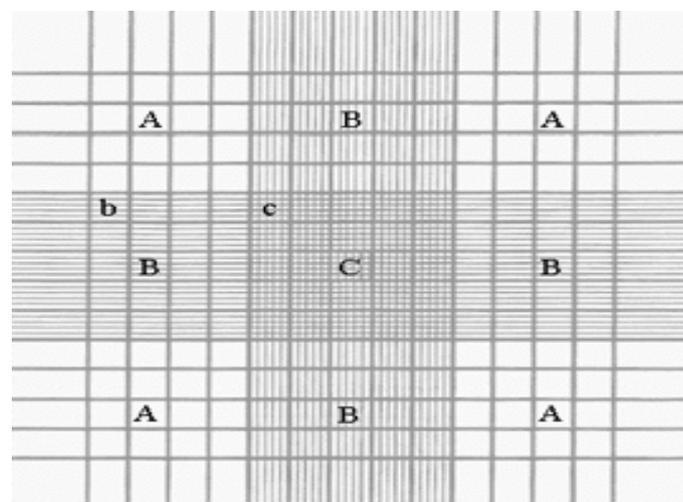


Figura 1: Câmara de Neubauer com marcações em quadrantes de medidas conhecidas e pontos de amostragem para contagem. Fonte: Vieira (2000).

Da mesma lâmina, foram capturadas aleatoriamente 25 imagens no quadrado superior direito da câmara, identificado como

“A” na Figura 1. As imagens capturadas foram avaliadas por visão humana e posteriormente utilizadas para a contagem com o BioViC. O número obtido nessa contagem foi multiplicado por 4, pelo valor da diluição e por 10^7 para obter o número de células da área de contagem, que foram expressas em células/L.

2.5 Avaliação das células viáveis de leveduras por contagem pelo software BioViC.

Foi utilizado um módulo baseado em Visão Computacional desenvolvido com o objetivo de detectar automaticamente as leveduras nas imagens digitalizadas. Devido ao formato circular das leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, sua localização foi feita utilizando a Transformada Circular de Hough (TCH), utilizando técnicas de pré-processamento, detecção, extração de atributos e classificação. No pré-processamento um filtro de suavização foi empregado na imagem original para redução da variação de brilho e das falhas.

Após o pré-processamento, a TCH foi utilizada para mapeamento dos “pixels” da imagem gerada pelo filtro. Com o término da execução da transformada todas as posições dos pontos máximos de Hough foram armazenadas.

Por fim as informações de atributos de forma, cor e textura foram extraídas. Após a extração dessas características o módulo de classificação foi utilizado para o treinamento e

classificação das leveduras em viáveis e inviáveis.

2.6 Análise estatística

Os resultados das avaliações de células viáveis e inviáveis, destacadas pelo corante vital e das viáveis obtidas em contagem em placa foram calculados em médias que foram submetidas a análise de Variância com teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os métodos utilizados para avaliação de células de leveduras foram comparados por meio da análise estatística de Correlação de Pearson utilizando o software MYSTAT 12.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações e contagens obtidas ajustadas para o mesmo índice (10^{11}) de células de leveduras ao longo do processo de fermentação são apresentadas nas Tabelas 01, 02 e 03. Observa-se que como esperado o teor de açúcares do mosto caiu de 12° Brix até 3° Brix, quando a fermentação foi considerada estabilizada para fins de contagem.

A contagem em placas é considerada como método padrão para leveduras viáveis. O método se baseia na premissa de que cada célula microbiana presente em uma amostra irá formar uma colônia separada e visível, quando fixada em meio de cultura apropriada (TANIWAKI, 2001).

Tabela 01: Número de células viáveis de leveduras em amostras de fermentação a °Brix 12 contadas em placas e avaliadas por corante azul de metileno em imagens captadas em lamina de Neubauer com e sem retículos (média de 3 repetições).

Método de Contagem	Células Viáveis 10.¹¹/L
Plaqueamento <u>Com imagens captadas em Neubauer</u>	2,4100 a
Análise com BioVIC <u>Análise com visão humana</u>	2,0640 ab
Sem retículos (A)	1,8613 ab
Com retículos (C)	1,6133 b
Média geral	1,9887
CV %	10,25
Desvio padrão	0,2036

* Médias seguidas por uma mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade.

Nos resultados obtidos no experimento observou-se menores contagem com corante vital quando comparada a contagem em placa que resultou em 2,4100.10¹¹ UFC/L, sendo esse valor 30% maior que a média dos avaliados nos métodos diretos. Quando os valores obtidos no plaqueamento foram confrontados com os demais métodos de contagem, foi maior que a análise por visão humana quando as linhas foram incluídas na imagem (amostragem C). A contagem realizada pelo BioViC e pela visão humana amostrada no quadrante A não diferiram entre si, mas foram maiores que as obtidas por visão humana quando as linhas foram incluídas na imagem (amostragem C).

Esses resultados encontram apoio na literatura. Oppenoorth, (apud GERHARD,

1960) comparou métodos com corante rodamina B, azul de metileno e cultivo em placas. Encontrou na avaliação com rodamina um número de células viáveis superior ao obtido com corante azul de metileno, porém ambos os valores foram menores do que as células encontradas através do método de plaqueamento.

Koch *et alii.* (1986) relatam que a contagem de células de levedura pela câmara de Neubauer apresenta falta de precisão, proporcionando contagens mais baixas, confiáveis apenas em concentrações muito elevadas de células/mL.

Comparando-se a contagem das células de leveduras viáveis obtidas pela visão humana e pelo BioVIC com (C) e sem (A) as linhas demarcatórias da câmara de Neubauer, constata-se que, embora o valor obtido pelo *software* tenha apresentado valores mais altos de concentração de células viáveis do que as obtidas por visão humana a diferença não foi significativa em Brix inicial de 12.

Os resultados da Tabela 02 mostram os valores ainda superiores para plaqueamento em relação a avaliação por corante vital azul de metileno, mas menores que as obtidas em Brix 12.

Os resultados discrepantes ficaram ainda mais evidentes.

Fink e Weinfurtner, (apud GERHARD, 1960), relatam que o número de células mortas coradas pelo azul de metileno depende do pH, e que certas células vivas em suspensão na

água destilada podem se colorir com a adição de açúcar. Afirmam ainda que o azul de metileno pode colorir as células mortas sob condições fisiológicas normais, mas que a correlação é pior quando as células de levedura foram mortas por meios não fisiológicos, como a radiação ultravioleta ou anti-sépticos.

Tabela 02: Número de células viáveis de leveduras em amostras de fermentação a °Brix 6 contadas em placas e avaliadas por corante azul de metileno em imagens captadas em lamina de Neubauer com e sem retículos (média de 3 repetições)

Método de Contagem	Células Viáveis 10¹¹/L
Plaqueamento	2,6733 a
<u>Com imagens captadas em Neubauer</u>	
Análise com BioVIC	1,1853 b
<u>Análise com visão humana</u>	
Sem retículos (A)	1,1455 b
Com retículos (C)	0,9426 b
Média geral	1,1487
CV %	9,95
Desvio padrão	0,1143

* Médias seguidas por uma mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade.

Quando a fermentação estabilizou em Brix 3 (Tabela 03) as metodologias não mais registraram diferenças entre as contagens, mesmo considerando a contagem em placas, que continuou a apresentar os valores mais altos de células viáveis.

Tabela 03: Número de células viáveis de leveduras em amostras de fermentação a °Brix 3 contadas em placas e avaliadas por corante azul de metileno em imagens captadas em lamina de Neubauer com e retículos (média de 3 repetições)

Método de Contagem	Células Viáveis 10¹¹/L
Plaqueamento	2,2833 a
<u>Com imagens captadas em Neubauer</u>	
Análise com BioVIC	1,7706 a
<u>Análise com visão humana</u>	
Sem retículos (A)	1,7920 a
Com retículos (C)	1,7440 a
Média geral	1,8975
CV %	54
Desvio padrão	0,1143

* Médias seguidas por uma mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade.

No decorrer da fermentação, as leveduras são influenciadas por fatores que causam estresse, implicando diretamente sobre a viabilidade celular (BASSO e AMORIN, 1997). Dentre esses fatores podem ser destacadas: a temperatura, teor de etanol, contaminação bacteriana e formação de ácidos orgânicos (NGANG *et alii*, 1989). Portanto então seria esperado um decréscimo acentuado no número de células de leveduras viáveis com 0Brix 6 e 3, fato esse não observada em nenhum dos métodos aplicados para a contagem das leveduras.

Os resultados obtidos de correlação simples mostraram uma alta correlação (0,890) entre as contagens realizadas por visão humana nas

imagens captadas da câmara de Neubauer com e sem linhas, porém a maior significância foi observada quando foram confrontadas as contagens feitas pelo BioVIC e pela visão humana na câmara de Neubauer sem linhas (0,984). Dessa forma fica comprovado que o uso destes quadrantes sem linhas da câmara de Neubauer como campos de análise podem ser utilizados com vantagens para a captação de imagens com posterior análise automatizada e assim agilizar a contagem de células viáveis para o acompanhamento durante o processo industrial de fabricação do etanol.

Já a técnica de contagem por plaqueamento apresentou diferenças significativas quando foram comparadas com as contagens feitas pela visão humana (com linhas e sem linhas) e pelo BioViC, respectivamente.

Os resultados obtidos discordaram daqueles de Trevors *et alii* (1983) que utilizaram oito métodos de contagem de células viáveis e obtiveram correlação aceitável entre a contagem de células de levedura com o corante azul de metileno em câmara de Neubauer e com a técnica padrão de contagem em placa com quatro linhagens de *Saccharomyces* cultivadas em meio MYGP (extrato de malte, peptona e glicose) e incubadas a 25 °C.

Esses resultados discrepantes podem ser explicados justamente pela manutenção das condições do meio, pH e temperatura, de forma que não se pode afirmar que essas

leveduras passaram por estresse. Além disso, os autores (TREVORS *et alii*, 1983) enfatizam que uma técnica de contagem pode ser mais ou menos adequada para as diferentes espécies ou variedades, dependendo do objetivo da utilização desses microrganismos e, principalmente, em fermentações em escala industrial.

Como a viabilidade celular é sem dúvida um aspecto importante no controle da fermentação alcoólica, quanto maior o número de leveduras viáveis, melhor será o desempenho do processo. Como foi justificado, embora tenha se mostrado a forma mais fidedigna de contar células viáveis, o uso de placas não é possível nas indústrias em razão da fermentação terminar antes das 72 horas estipuladas para sua contagem .

Quanto ao método usado nas usinas, com contagens por visão humana, é adequado por ser rápido, mas apresenta limitações pela forma subjetiva de contar as células, além de consumir muito tempo do usuário por ser manual.

A automação poderá resolver essa questão, melhorando o grau de acerto, sem utilizar mais tempo que a avaliação clássica em câmara de Neubauer, principalmente se ao menor tempo e maior exatidão forem computadas a possibilidade de prescindir da própria lâmina e a vantagem de armazenar imagens para contagens no momento mais adequado, sem perda da precisão.

4 CONCLUSÕES

Com esse artigo avaliou-se o desempenho de um sistema baseado em visão computacional que permite a contagem de células de leveduras viáveis de maneira automatizada, utilizando uma câmara de Neubauer. Os resultados obtidos permitiram estabelecer que o *software* BioVIC é eficiente e pode ser utilizado no processo de avaliação de células de leveduras em microbiologia industrial.

5 REFERÊNCIAS

- Alterthum, F. (1984). Efeito dos microorganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos, Campinas, v.3, n.1, pp. 42-49.
- Amorim, H.V.; Oliveira, A.J.; Zago, E.A. (1985). Fermentação descontínua: otimização do processo Melle-Boinot. In: Semana de fermentação alcoólica "Jaime Rocha de Almeida", Piracicaba. Anais. Piracicaba: ESALQ/STAB, pp. 114-121.
- Amorim, H.V.de (2011). O avanço da fermentação. Revista opiniões. Ribeirão Preto-SP. pp. 40-42.
- Basso, L.C.; Alves, D.M.G.; Amorin, H.V. (1997). The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. Revista de Microbiologia, v.28, supl.1, pp. 77-87.
- Ceccato - Antonini, S.R.(1996). Guia prático de microbiologia. Araras: UFSCar.
- Cecatto-Antonini, S.R. (2004). Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria. Universidade Federal de São Carlos, Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Econômica Rural, Centro de Ciências Agrárias, São Carlos,S.P.
- Ceccato-Antonini, S.R. (2010). Microbiologia da fermentação alcoólica. A importância do monitoramento microbiológico em destilarias. São Carlos: EduFSCar, 105 p.
- Cabrini, K.T.; Gallo, C.R. (1999). Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do Estado de São Paulo, Brasil. Scientia Agrícola. Piracicaba, v.56, n.1, pp.207-215.
- Escobar, M.R. (2003). Viabilidade econômico-financeira da energia cogenerada do bagaço de cana in natura. Revista Informações Econômicas, São Paulo, v.33, n.9.
- Fialho Junior, C.F. (2007). Efeitos de três concentrações de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) na produção de etanol de caldo de cana (*Sacharum Officinarum*). Monografia. Campo Grande, MS.
- Gallo, C.R; Canhos, V.P. (1991). Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica revisão. STAB. Açúcar,Álcool e Subprodutos, Campinas, v. 9, n.1, p. 35-40.
- Gerhard, J.H. (1960). Microbial control methods in the brewery In: Wayne W. 53 Umbreit, W. W. Advances Applied Microbiology, Vol 2, pp. 113-158.
- Koch, A. H.; Bandler ,R.; Gibson, R.R. (1996). Fluorescence Microscopy Procedure for Quantitation of Yeasts in Beverages. Applied and Environmental Microbiology, v.5, n.3, pp.599-60.
- Hammond, J.R.M. (1995). Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century. Progress to date. Yeast, v.11, n.16, pp.1613-1627.
- Lee, S.S.; Robinson, F. M.; Wang, H.Y. (1981). Rapid determination of yeast viability. Biotechnology and Bioengineering Symposium, n.11, p.641-649.

- Lucarini, A.C.; Silva, L. A. da ; Bianchi, A.C. (2004). Um sistema para a Contagem semi-automática de microorganismos. Pesquisa & tecnologia FEI,- Nº 26.
- Macedo, I.C. (2007). Situação atual e perspectivas do ϵ 57 Estudos avançados, v. 21, n. 59.
- Mongelo, A.I. ; Silva, D. S. ; Quinta, L. N. ; Pistori, H. ; Cereda, M. P. (2011). Validação de método baseado em visão computacional para automação da contagem de viabilidade de leveduras em indústrias alcooleiras. In: VIII Congresso Brasileiro de Agroinformática SBIAGRO, 2011, Bento Gonçalves. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Agroinformática - SBIAGRO.
- Neder, R.N. (1992). Microbiologia : Manual de laboratorio. São Paulo: Nobel, 138 p.
- Ngang, J.J.E.; Letourneua,F.; Villa, P. (1989). Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. Applied and Microbiological Biotechnology, v.31, pp.125-128.
- Rouge, M. (2002) Counting Cells with a Hemacytometer. Disponível em <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/hemacytometer.html>
- Russ, J. C. (1995). The Image Processing Handbook, 2nd Edition, CRC, Shapiro, L; Stockman, G. Computer vision. New Jersey: Prentice Hall.
- Shapiro, L; Stockman, G. (2001). Computer vision. New Jersey: Prentice Hall.
- Vieira, B. A. H. (2000) Como Utilizar a Câmara de Neubauer. Disponível em <http://bervieira.sites.uol.com.br/neubauer.htm>. Acesso em 15/03/2012.
- Taniwari, M.H.; Silva ,N. Da; Banhe, A.A.; Iamanaka, B.T.; Silva, N. (2001). Comparison of culture media, simplate, and petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. Journal of Food Protection, v.64, n.10, pp.1592-1596.
- Tortora, G. J. Funke, B. R., Case, C. L. (2002). Microbiologia. Porto Alegre: Artmed, 827p.
- Trevors, J.T.;Merrick, R.L.; Russel, I. et al. (1983), A Comparison of methods for assessing viability. Biotechnology Letters, Vol. 5, pp.131-134.
- Wheals, A.E.; Basso, L.C.; Alves, D.M.G.; Amorim, H.V. (1999). Fuel ethanol after 25 years. Trends Biotechnology, 17, 482-487.
- Yokoya, F. (1991). Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos, v. 9, n. 6, pp. 38-39.

5-CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método padrão para contagem de micro-organismos utilizado tradicionalmente nas usinas é a contagem manual em câmara de Neubauer com coloração por azul de metileno. No entanto incorre na subjetividade de cada operador e assim como também o tempo consumido. Com isso a implementação de um sistema automático de contagem de células viáveis e inviáveis durante o processo de fermentação é essencial para redução do tempo de tomada de decisão minimizando assim o custo de produção.

A pesquisa desenvolvida com o *software* BioViC apresentou resultados positivos quanto ao seu uso. De acordo com os objetivos iniciais, com os resultados obtidos foi possível estabelecer uma correlação aceitável de avaliação de células de leveduras pelos métodos aplicado e o *software* proposto.

Das dificuldades encontradas inicialmente, pode-se mencionar as linhas de demarcação encontradas nas lâminas de Neubauer, que eram captadas juntamente com as imagens a serem processadas. Esse problema foi solucionado com imagens feitas em campos da câmara de Neubauer cujos quadrantes possuem uma área maior, evitando dessa forma que as linhas demarcatórias dos quadrados interferissem negativamente no processamento das imagens.

É preciso também levar em consideração que as usinas já investiram em microscópios óticos e dispõem de resultados de anos com o método de corante vital, que não podem ser simplesmente descartados. Deve ser ressaltado que a técnica de contagem utilizando a Câmara de Neubauer com coloração vital será mantida, mas pode ser agilizada pela automação da contagem e assim proporcionar a rápida análise dos relatórios produzidos, além de possibilitar um número maior de análises por dorna e por unidade de tempo.

NORMA PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA SBA- Controle & Automação

Apresentação da Revista SBA - Controle & Automação

ISSN: 1807-0345 (Scielo)

ISSN 0103-1759: (Impresso)

A Sociedade Brasileira de Automática, SBA, foi fundada em 1975 em decorrência de uma necessidade de intercâmbio entre os especialistas brasileiros atuantes na área de Automação e Controle, e entre esses e seus pares internacionais representados principalmente pela International Federation of Automatic Control (IFAC).

Visando criar um espaço para divulgação de artigos técnico-científicos que ofereçam contribuições relevantes nas áreas de Controle e Automação, a SBA publica, desde janeiro de 1987, a Revista SBA - Controle & Automação.

A Revista é formada por um Corpo Editorial (Editor-Chefe e Editores Consultores) e Corpo de Revisores formado por especialistas da comunidade científica brasileira. O Editor-Chefe tem um mandato de três anos, e é escolhido pelo CTA, em comum acordo com a Diretoria.

Como política editorial, o seguinte critério é adotado para seleção dos trabalhos. Todo artigo submetido à Revista SBA - Controle & Automação é encaminhado ao editor-chefe da Revista que o encaminha a um editor consultor especialista na área. Este por sua vez envia o artigo a três revisores que emitirão um parecer circunstanciado no prazo máximo de três meses. Baseado no teor destes documentos, o editor consultor emite um parecer, aceitando, rejeitando, ou sugerindo sugestões para uma nova versão. Este parecer é, em geral, referendado pelo editor-chefe da Revista. Em caso de haver uma nova versão, o processo todo se repete.

Em 1997 a revista passou a ter duas formas de divulgação: - uma eletrônica, neste próprio site; - e a versão impressa. Em 2003, a versão eletrônica passou a ser divulgada pela plataforma Scielo. Na sua versão impressa a tiragem tem sido em torno de 800 exemplares. A versão impressa é distribuída para todos sócios da SBA que estiverem em dia com sua anuidade.

Marcos históricos:

1987: Primeiro volume, a revista sai com artigos convidados;

1988-1993: os volumes 2, 3 e 4, saem com uma periodicidade de 2 anos;

1994: a revista atinge uma maturidade e passa a ter uma regularidade de publicação anual;

1995: a partir do volume 6, a revista passa a ter 3 números por ano;

1997: lançada a versão eletrônica da revista neste site;

2003: a partir do volume 14, a revista passa a publicar 4 números por ano. Neste mesmo ano a versão eletrônica da revista passa a ser divulgada na plataforma Scielo;

2010: a partir do volume 21, a revista passa a ter 6 números por ano.

Como Publicar

Os artigos publicados na revista Controle & Automação passam por um processo seletivo pelo seu Conselho Editorial. Os passos deste processo são:

- ✓ Submissão de artigo por meio do sistema eletrônico de submissão;
- ✓ Julgamento sob a responsabilidade de um dos editores associados;
- ✓ Se necessário, um ciclo de revisões é iniciado entre o autor e a editoria;
- ✓ Se o artigo for considerado inadequado para publicação, o processo se encerra;
- ✓ Se o artigo for aceito, é solicitado ao autor uma versão definitiva do mesmo para publicação.

O Editor Chefe poderá, ouvidos os editores associados da área, convidar autores de grande notoriedade a contribuir com artigos convidados.

Submissão

O manuscrito submetido (arquivo em PDF) deverá obedecer ao estilo adotado pela revista (principalmente naquilo referente às citações e referências, numeração de seções, de figuras, de tabelas e de equações). Este estilo é baseado naquele

adotado na revista AUTOMATICA do IFAC. Apesar de ser desejável que os artigos submetidos já estejam na diagramação final da revista, na submissão e durante o ciclo de revisões isto não é necessário. Em todo caso é importante assegurar que, em sua diagramação final, o artigo esteja limitado a 12 páginas. Artigos submetidos que notadamente ultrapassem este limite serão rejeitados antes de qualquer análise. Os artigos devem ser submetidos preferencialmente em inglês, aceitando-se também artigos escritos em português e espanhol. Independente do idioma usado no texto, todos os artigos devem conter um título e um resumo (abstract) em inglês. Os artigos devem ter cunho científico e normalmente apresentar contribuição original, sendo aceitáveis também artigos didáticos em áreas de interesse.

A Submissão de manuscritos e todo o acompanhamento do processo de revisão deverão ser feito por meio do IESS, o sistema eletrônico de submissão e acompanhamento de trabalhos, que pode ser acessado no seguinte endereço: http://www.fee.unicamp.br/sis_sba.

Publicação

Assim que um artigo for aprovado, o autor responsável pela submissão é convidado a enviar, por email, para a secretaria da Revista todos os arquivos necessários (texto e ilustrações) à geração da versão definitiva para publicação. Esta versão deverá conter todas as sugestões do editor associado.

O processo de diagramação final é feito em LATEX, pela secretaria da Revista a partir dos arquivos recebidos. Os arquivos da versão definitiva poderão estar redigidos em LATEX ou em MS-Word (na versão 6.0). Entretanto, como os arquivos em formato MS-Word serão convertidos para o formato

Descrição dos estilos MSWORD usados na revista Controle & automação

Resumo Este texto descreve os estilos de formatação de texto presentes no gabarito rsbasty.dot a ser utilizado com o MSWORD com versão acima da 6.0. O documento inicia com uma descrição geral da diagramação dos artigos e depois cada um dos estilos é descrito separadamente. Esta versão apresenta correções e

alterações na seção 4 (Como usar este gabarito), resultantes de sugestões de usuário.

Palavras Chaves: MSWORD, estilos de diagramação, Revista Controle & Automação.

Abstract: This text describes all styles present in template "rsbasty.dot", to be used with MSWord 6.0 or newer. This document begin with a general description of the format followed by a description of each styles

Keywords: MSWORD, format styles, Revista Controle & Automação.

1. Introdução

Este gabarito e os estilos definidos por ele tentam aproximar a formatação gerada pelo MS WORD daquela gerada pelo LATEX. Infelizmente, alguns recursos do MS WORD foram evitados para esta compatibilização. Em outros casos, o MS WORD não dispõe de recursos para o tratamento de alguns necessidades da formatação. Por exemplo, o MS WORD não trata automaticamente o estilo de citações adotado pela revista.

Neste documento é utilizado uma seção de "Referências Bibliográficas" só para ilustração do estilo, sem nenhuma correlação com este texto.

2. Dimensões

A diagramação da revista C&A se baseia nas dimensões de papel A4 ou seja, 210 mm de largura por 297 mm de altura. Esta diagramação define dois tipos de páginas, a saber:

- Primeira página;
- Páginas internas.

A principal diferença neste dois tipos de páginas é que na primeira página aparecem o título do artigo e uma nota de rodapé que descreve a tramitação de revisão do artigo. Esta nota é preenchida exclusivamente pela secretaria de edição da revista.

O artigo é escrito em duas colunas. Somente o quadro formado pelo título, autores e endereço se sobrepõe as duas colunas.

A tabela 1 resume todas as dimensões na página.

Nome	Dimensão
Papel A4	210mm x 297mm
Margem interna	10 mm
Margem externa	10 mm
Margem entre colunas	10 mm
Largura de coluna	90mm
Margem Superior	10 mm
Margem inferior	10 mm
Distância entre o corpo do texto e o rodapé	5 mm
Largura do quadro de título	277 mm

1. O Quadro de Título

Na primeira página, é colocado um quadro com o título do artigo, seguido de uma ou mais linhas com os nomes dos autores. Termina o quadro, uma ou mais linhas com os endereços dos autores.

Este quadro é delimitado por dois conjuntos de linhas horizontais.

Este quadro não tem nenhuma restrição de altura. Esta irá depender do tamanho do título, do número e nome dos autores e dos endereços dos mesmos.

1. Dimensões do conjunto de linhas horizontais do quadro do título.

São duas linhas horizontais espaçadas entre si de 10pt. A linha superior, mais grossa, tem a espessura de 6pt. A linha inferior, mais fina, tem espessura de $\frac{1}{4}$ pt.

Este conjunto de linhas é implementada com uma linha de texto em branco no estilo normal, mas com borda superior e inferior, nas espessuras especificadas acima.

segundo ajustado na margem direita da coluna, para alinhar a numeração de equações.

Instruções aos Autores

Editoria da Revista CONTROLE & AUTOMAÇÃO

Visando padronizar a apresentação dos artigos publicados na revista CONTROLE & AUTOMAÇÃO, bem como agilizar o seu processo de edição e revisão, encaminhamos as seguintes orientações para os autores e revisores de artigos. Estas orientações são baseadas no formato proposto em *Information for Contributors to Automatica* disponível na contra-capas do periódico "AUTOMATICA" do IFAC (International Federation of Automatic Control).

1. - Estilo Geral

Os artigos devem ser preparados de acordo com os itens abaixo. A ordem dos itens deve ser mantida como a seguir:

Título e nome dos autores,

- Use um título informativo para o artigo.
- os nomes dos autores deverão estar acompanhados das suas afiliações.

Resumo e *Abstract*

Inclua um resumo em português com cerca de 100 a 200 palavras no início do artigo. Este resumo deverá fazer uma descrição do problema tratado, as idéias principais introduzidas e os resultados. Logo após o resumo deverá ser colocado a sua tradução para o inglês (*abstract*).

Corpo do Artigo

O corpo do artigo poderá ser dividido em seções numeradas com numerais arábicos. O corpo do artigo começa com uma seção de introdução e termina com uma seção de conclusão.

Agradecimentos

Quando for apropriado.

Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas deverão obedecer ao estilo descrito a seguir na seção 2.

Apêndices

Se for necessário, os textos anexos poderão ser colocados no final do artigo. Estes deverão ser numerados por letras.

2. - Referências Bibliográficas

Os itens da bibliografia deverão ser colocados no final do artigo em ordem alfabética do sobrenome do primeiro autor. A ordenação de diversos itens com o mesmo primeiro autor é feita em função do ano da publicação. Cada item deverá obedecer aos seguintes estilos:

2.1 - Estilo para Referência de Artigos de Periódicos:

É dividido nos seguintes campos:

Autores (Ano da publicação). Título. Periódico (mês), Volume, Páginas.

Os campos *Autores* e *Ano da publicação* obedecem aos estilos descritos na seção 2.6. O campo *Título* do artigo é escrito em letras normais e deve ser terminado por "." (ponto final). O campo *Periódico* deve ser destacado em itálico. Se o periódico precisar ser identificado por mês, este é colocado entre parênteses logo após o campo *Periódico*. Os demais campos são separados por vírgulas.

Exemplos:

Ljung (1985). On the estimation of transfer functions. *Automatica*, **21**, 677—708

Watanabe, E. H. & R.M. Stephan (1991). Potência Ativa e Reativa Instantânea em Sistemas Elétricos com Fontes e Cargas Genéricas. *Controle & Automação*, Vol. 3, nº1, pp 253-260 .

Chen, T.C. (1971). Parallelism, Pipelining and Computer Efficiency. *Computer Design* (Jan.), 69—74.

2.2 - Estilo para Referência de Livros:

É dividido nos seguintes campos:

Autores (Ano da publicação). Capítulo. Editor, Título. Volume, Páginas, Edição, Editora, Localização.

Os campos *Autores* e *Ano da publicação* obedecem aos estilos descritos na seção 2.6. Os campos *Capítulo* e *Editor* se aplicam à referência de capítulo de livro escrito pelos autores. Neste caso o campo *Capítulo* indica o nome do capítulo e é terminado por "." (ponto final), os demais campos são separados por vírgulas. O campo *Editor* indica o nome do editor. Este campo começa com a palavra "In", cita o nome do editor e termina pela expressão "(ed.)". O campo *Título* com o nome do livro deve ser destacado em *itálico*. O campo *Localização* identifica o local onde foi publicado o livro. Os campos *Volume* e *Páginas* só devem ser utilizados se forem necessários.

Exemplos:

Abell, B.C., R.G. Tagg and M.Rush (1954). Enzyme-catalyzed cellular transmission. In A.F. Round (Ed.), *Advances in Enzymology*, Vol. 2, pp. 125—247, 3rd ed. Academic Press, New York

Åström, K.J. and B. Wittenmark (1989). *Adaptative Control*. Addison—Wesley, Reading, MA.

Hill, F.J. and G.R.Peterson (1978). *Digital Systems: Hardware Organization and Design*. Wiley, New York.

2.3 - Estilo para Referência de Anais

É dividido nos seguintes campos:

Autores (Ano da publicação). Título. Evento, Local, Páginas.

Os campos *Autores* e *Ano da publicação* obedecem aos estilos descritos na seção 2.6. O campo *Título* da publicação é escrito em letras normais e deve ser terminado por "." (ponto final). Os demais campos são separados por vírgulas. O campo *Evento* deve ser destacado em itálico.

Exemplos:

Levine, W.S. and R.T. Reichert (1990). An Introduction to H_∞ Control System Design. *Proc.of the 29th Conference on Decision and Control*, Honolulu, Hawaii, pp. 2966-2974.

Balchen, J.G. and B. Lie (1986). An adaptive controller based upon continuous estimation of the closed loop frequency response. *Preprints IFAC Workshop on Adaptive Systems in Control and Signal Processing*, Lund, Sweden.

Pomilio, J.A., M.V. Lopes e M.H. Klinke Jr. (1988). Características de Transferência de Recortador C.A. *Anais do 7º Congresso Brasileiro de Automática*, São José dos Campos S.P., pp. 400—405.

2.4 - Estilo para Referência de Publicações Internas (Relatórios, memorandos...etc.)

É dividido nos seguintes campos:

Autores (Ano da publicação). Título. Número do documento, Entidade, Localização.

Os campos *Autores* e *Ano da publicação* obedecem aos estilos descritos na seção 2.6. O campo *Título* da publicação é escrito em letras normais e deve ser terminado por "." (ponto final). Os demais campos são separados por vírgulas.

Exemplo:

Åström, K.J. (1975). Lectures on system identification—Frequency response analysis. Report 7504, Department of Automatic Control, Lund Institute of Technology, Lund, Sweden

2.5 - Estilo para Referência de Dissertações e Teses

É dividido nos seguintes campos:

Autor (Ano da publicação), Título. Tipo da publicação, Localização.

Exemplos:

Petri, C.A. (1962). Kommunikation mit Automaten. Ph.D. Dissertation, University of Bonn, Bonn, West Germany.

Adade Fo., A. (1991). Projeto de Sistema de Controle Multivariáveis Robustos Utilizando Otimização Multicritérios. Tese de Doutorado, Instituto Tecnológico de Aeronáutica, ITA-IEEE, S. José dos Campos - SP.

2.6 - O campo Autores

Este campo deve obedecer ao seguinte estilo:

O nome do primeiro autor é dado pelo seu sobrenome seguido de vírgula e a abreviatura do primeiro e dos nomes intermediários, por exemplo:

Xavier, J.J.S. para Joaquim José da Silva Xavier

Os nomes dos demais autores são dados pelas abreviaturas do primeiro e segundo nome seguido pelo sobrenome por extenso. Deve ser evitado o uso de *et alii*, ou seja todos os autores devem ser citados no campo *autores*. Cada nome de autor deverá ser separado por vírgula. Por exemplo:

Chen, T.C.

Clarke, D.W., C. Mohtadi and P.S. Tuffs

2.7 - O campo Ano da publicação

Logo após o campo *Autores* deve ser colocado entre parênteses o ano da publicação, este campo é terminado por um "."(ponto final).

Se, por exemplo, o mesmo primeiro autor estiver com dois ou mais itens da bibliografia num mesmo ano, o campo *ano da publicação* deverá ter uma letra para distinguí-los, por exemplo, num determinado artigo pode haver as seguintes referências do mesmo primeiro autor(Åström):

Åström, K. J. (1988). Assessment of achievable performance of simple feedback loops, 1988 *IEEE Conf. Decision and Control*, Austin, Texas.

Åström, K. J. and T. Hägglung (1988a). *Automatic tuning of PID controllers*. ISA, Research Triangle Park, North Caroline

Åström, K. J. and T. Hägglung (1988b). A new auto-tuning design. *Proc. IFAC Int. Symp. on Adaptive Control of Chemical Processes*, Copenhagen, Denmark.

3. - Citações

3.1 - Citação a item bibliográfico com um único autor

Os itens da bibliografia devem ser citados no texto pelo sobrenome do primeiro autor e pelo ano da publicação.

3.2 - Citação a item bibliográfico com dois autores

Quando o trabalho a ser citado tiver dois autores, a citação é feita pelo sobrenome dos dois autores seguido do ano.

3.3 - Citação a item bibliográfico com mais que dois autores.

Quando o trabalho a ser citado tiver mais de dois autores, a citação é feita pelo sobrenome do primeiro autor e a expressão *et alii* em itálico seguido do ano.

3.4 Existem duas formas de citar um item da bibliografia:

3.4.1 - Quando a citação faz parte do texto,

Neste caso os nomes dos autores são colocados no texto seguido do ano da publicação entre parênteses, por exemplo, considere os seguintes trechos de artigo:

"... os resultados obtidos em Åström (1988)..."

"... Balchen e Lie (1986) provaram que..."

"... como descrito por Pomilio *et alii* (1988) ..."

No primeiro exemplo, é citado um item da bibliografia escrito por um único autor (primeiro item do exemplo da seção 2.7) em 1988. No segundo exemplo, é citada uma publicação escrita por dois autores em 1986 (segundo item do exemplo da seção 2.3). No terceiro exemplo, é feita uma citação a um trabalho escrito por mais de dois autores em 1988 (terceiro item do exemplo da seção 2.3).

3.4.2 - Quando a citação não faz parte do texto, mas é indicada para consulta.

Neste caso, os parênteses devem envolver o nome dos autores e o ano da publicação separados por vírgula, por exemplo:

"... técnicas de controle adaptativo são aplicadas (Åström, 1988)."

"...é fácil provar (Balchen e Lie, 1986) que...."

"... como descrito na literatura (Pomilio *et alii*, 1988) ..."

Se num mesmo ponto for necessário citar mais de um item da bibliografia, isto é feito por um único entre-parênteses. Neste caso os diversos itens são separados por ponto-e-vírgula. Por exemplo:

"... os resultados descritos na literatura (Åström, 1988; Balchen e Lie, 1986; Pomilio *et alii*, 1988) comprovam que"

4. - Estilo para as expressões matemáticas.

De uma forma geral, as expressões matemáticas no texto ou em quadros de equações obedecem ao seguinte:

4.1 - As variáveis devem ser expressas em tipo itálico.

4.2 - As matrizes e os vetores devem ser expressas em tipo negrito.

4.3 - Nos quadros de equações será assumido que na ausência de indicação contrária todas as letras estarão em itálico.

5. - Estilo para as Ilustrações

De uma forma geral, deve ser lembrado que a publicação será feita em "preto e branco", assim deve-se evitar destacar itens na ilustração por cores. As ilustrações podem ser de três tipos:

5.1 - Quadro de equações

Os quadros de equações são indicados por numerais arábicos entre parênteses ajustados a direita. A referência a uma equação é feita pelo seu numeral entre parênteses, por exemplo:

"...aplicando-se a equação(4) na equação(5) obtem-se..."

5.2 - Quadro de figuras

Os quadros de figuras são indicados pela palavra "Figura" seguida de um numeral arábico e de um texto associado. Esta indicações devem ser colocadas abaixo do quadro da figura. As referências a uma figura são feitas pelo seu numeral, por exemplo:

"... como ilustrado na figura 5..."

5.3 - Quadro de tabelas

Os quadros de tabelas são indicados pela palavra "Tabela" seguida de um numeral arábico e de um texto associado. Estas indicações devem ser colocadas acima do quadro da tabela. As referências a uma tabela são feitas pelo seu numeral, por exemplo:

"...conforme a tabela 4..."