

Determinação da Concentração de CBD-FITC Adsorvidos em Fibras por Análise de Imagem

António Luís Amaral^{1,2}, Ricardo Pinto¹, Joana Carvalho¹, Eugénio Campos Ferreira¹ e Miguel Gama¹

¹Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho
4710-057 Braga, Portugal. E-mails: ecferreira@deb.uminho.pt; lpamaral@deb.uminho.pt

²Departamento de Tecnologia Química, ESTIG, IPB
Apartado 1038, 5301-854 Bragança, Portugal. E-mail: lpamaral@ipb.pt

RESUMO

Neste trabalho, foi elaborado um programa de processamento e análise de imagem para a determinação da quantidade de CBD-FITC adsorvido em fibras de celulose. Este programa consiste em duas fases em que a primeira se dedica à elaboração da curva de calibração e a segunda à determinação da concentração do CBD-FITC adsorvido. Para a elaboração da curva de calibração é necessário proceder a uma prévia aquisição de amostras de celulose com uma concentração de CBD-FITC espacialmente uniforme e conhecida. A curva de calibração é então obtida com recurso a uma interpolação multivariável por polinómios. Na segunda fase deste programa as imagens das fibras são primeiramente convertidas em concentração, através da curva de calibração obtida, e seguidamente o utilizador pode seleccionar a(s) zona(s) da(s) fibra(s) para a determinação da concentração do CBD-FITC. Esta concentração permitirá conhecer a distribuição dos CBD's na superfície das fibras de celulose.

INTRODUÇÃO

A maioria das celulasas possuem uma estrutura modular formada por um domínio catalítico, um domínio de ligação à celulose (*Cellulose-Binding Domain* - CBD) e uma cadeia de ligação altamente glicosilada (Srisodsuk *et al.*, 1993). Sabe-se que os CBD's possuem a capacidade de promover a actividade catalítica da enzima ao aumentar a sua concentração na superfície insolúvel da celulose (Black *et al.*, 1997). Esta propriedade parece provir da sequência específica de aminoácidos da CBD, como é o caso da celobiohidrolase I de *Trichoderma reesei*, que inclui 3 resíduos aromáticos de tirosina implicados na sua adsorção (Mattinen *et al.* 1997). Por seu turno Carrard *et al.* (2000) demonstrou que CBD's diferentes adsorvem em diferentes locais na superfície cristalina da celulose, enquanto que Pala *et al.* (2001) provou que, durante a produção de papel, a presença da CBD modificava as suas propriedades físicas.

Tendo em vista a importância da adsorção do CBD em celulose, o presente trabalho tem por objectivo a quantificação do CBD adsorvido numa superfície celulósica assim como verificar a sua influência nas propriedades superficiais, através da utilização de um complexo CBD-FITC fluorescente. Para o efeito foi estudada a aplicação de técnicas de análise de imagem que permitissem a quantificação da fluorescência emitida pelo complexo CBD-FITC e que pudesse ser correlacionada com a quantidade CBD-FITC adsorvida nas fibras. As técnicas de processamento e análise de imagem têm-se evidenciado cada vez mais como uma ferramenta extremamente útil num vasto leque de aplicações, principalmente nos últimos anos, uma vez que permitem eliminar a subjectividade da análise humana, por um lado, e extrair dados quantitativos que de outro modo seriam ou muito difícil ou até mesmo impossível de se obter. A comprovar este facto, nos últimos anos, tem sido evidenciado um incremento acentuado no uso de metodologias de análise de imagem em processos que envolvam a identificação ou

mesmo determinação quantitativa de fluorescência quer em microrganismos quer de corantes fluorescentes (Wiersba *et al.*, 1995 e Levy, 2001).

MATERIAL E MÉTODOS

Relativamente aos reagentes utilizados neste estudo, foi usado isotiocianato de fluoresceína (FITC) da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, USA), as fibras celulósicas utilizadas respeitavam à *Whatman* (CF11 - celulose pura) e as fibras secundárias foram gentilmente cedidas pela Portucel Viana. Todos os reagentes químicos utilizados são de pureza analítica (p.a.).

A preparação das fibras de celulose seguiu o seguinte procedimento: primeiro a preparação enzimática comercial *Celluclast*® (*Novozymes A/S*, Dinamarca) foi purificada por ultrafiltração com uma membrana de 30 kDa (*Pellicon 2 TFF System* da *Millipore*, EUA), após a qual foi digerida com papaína (1:1200, base proteica). Os CBD's foram separados através de uma ultrafiltração com uma membrana de 10 kDa (*Pellicon 2 TFF System* da *Millipore*, EUA), e seguidamente concentrados através de uma precipitação com sulfato de amónia (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após uma diálise, estes foram injectados num gel *Sepharose Fast-Flow* (*Amersham Pharmacia Biotech AB*, Suécia) e toda a proteína não adsorvida foi posteriormente colectada e liofilizada. A ligação do CBD ao FITC foi realizada pela adição de 20 µg de FITC por mg de CBD (numa concentração de 2 mg/mL de proteínas em tampão 0.1M HEPES, pH 9), durante um período de 12 horas com agitação magnética, à temperatura ambiente e protegida da luz. De modo a eliminar o FITC não ligado, a mistura de CBD-FITC foi filtrada numa coluna *BIO-GEL P-4* (*BIO-RAD*, Hércules, USA) previamente equilibrada com tampão de acetato de sódio 50 mM (Panreac, Barcelona, Espanha).

A aquisição das imagens da calibração e das fibras foi efectuada com recurso a um microscópio de fluorescência *AxiosKop* (*Zeiss, Oberkochen*, Alemanha) através de uma câmara de vídeo *AxioCam* (*Zeiss, Oberkochen*, Alemanha) e do software de aquisição *AxioVision* (*Zeiss, Oberkochen*, Alemanha). Todas as imagens foram adquiridas com um tamanho de 1300x1030 pixeis e com 24 bits de cor (8 bits por canal). No caso das imagens da calibração, foi também utilizada uma câmara de Neubauer, preenchida com soluções a concentrações definidas de CBD-FITC (*BCA Protein Assay Kit*, *Pierce*).

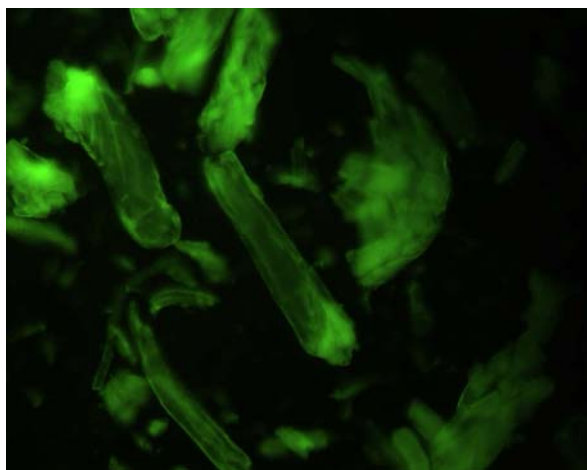


Figura 1 – Imagem de fibras com CBD-FITC adsorvido.

A quantidade de CBD-FITC por unidade de área (CBD_{calib}) nas imagens de calibração pode ser relacionada com a quantidade de CBD presente na solução depositada pela seguinte equação:

$$CBD_{calib} = \frac{[CBD] \cdot L}{M_w(CBD)} \text{ (mol/mm}^2\text{)}$$

Em que $[CBD]$ representa a concentração de CBD-FITC (em mg/mL), L a altura do líquido na câmara de Neubauer (0.1 mm) e $M_w(CBD)$ o peso molecular da CBD (8.43×10^9 µg/mol).

Os ensaios de adsorção do CBD-FITC às fibras foram realizados a 4 °C com soluções de CBD-FITC. Estas, foram postas em contacto com agitação e na ausência de luz, durante um período de 2 horas, com fibras de celulose (20 g/L) em tampão de acetato de sódio 50 mM, para um volume final de 4 mL. As fibras de celulose com CBD-FITC ligado foram então removidas por centrifugação a 3200 RCF durante 10 minutos (*Heracus Megafuge 1.0R*), sendo que a diferença entre a quantidade inicial de CBD-FITC e a remanescente no sobrenadante permitiu a determinação do CBD-FITC ligado.

Para a aferição da quantidade de CBD-FITC adsorvido nas fibras de celulose foi desenvolvido um programa dedicado de processamento e análise de imagem em ambiente *Matlab* (*The Mathworks, Inc, Natick*). Este programa consiste em duas sub-rotinas sendo a primeira para a elaboração da curva de calibração e a segunda referente à determinação da quantidade do CBD-FITC adsorvido nas fibras.

Na elaboração da curva de calibração foi necessário proceder previamente à aquisição de amostras (fibras celulósicas) com uma concentração espacialmente uniforme e conhecida de CBD-FITC. Para cada tempo de captura foram adquiridas em duplicado cerca de 5 a 10 concentrações diferentes. O primeiro passo desta fase consiste na determinação da função dos canais RGB (*Red, Green e Blue*) que maximizam a sensibilidade a pequenas variações de fluorescência. Esta função de expressão $I = f_R I_R + f_G I_G + f_B I_B$ permite fundir as 3 imagens dos canais obtidas (I_R , I_G e I_B) numa única imagem de intensidade I a partir do conhecimento dos factores de sensibilidade de cada canal (f_R , f_G e f_B). Para este efeito foi determinada a intensidade média de cada um dos canais RGB a diversas concentrações de CBD-FITC e tempos de captura. O factor de sensibilidade de cada canal foi então calculado a partir da razão entre a intensidade do canal e a soma das intensidades de todos os canais ($f_R = I_R / (I_R + I_G + I_B)$, $f_G = I_G / (I_R + I_G + I_B)$ e $f_B = I_B / (I_R + I_G + I_B)$) para cada tempo de captura de imagem e concentração. Finalmente, os factores de sensibilidade geral de cada canal foram determinados através do cálculo das médias dos valores assintóticos, relativamente à concentração, para cada tempo de captura. Aplicando estes factores às imagens de cada canal respectivo foi possível assim obter uma única imagem de sensibilidade máxima.

O objectivo último da primeira sub-rotina consistiu assim na elaboração uma curva de calibração para cada tempo de captura de imagem relacionando a concentração do CBD-FITC num dado ponto da imagem com o valor da intensidade nesse ponto e localização espacial do mesmo na imagem. Devido a limitações ao nível do tempo de execução do programa bem como de memória virtual necessária, o tamanho de cada imagem sofre uma redução para 1/5 do seu tamanho original (de 1300x1030 pixels para 260x206 pixels). Uma vez que as imagens originais são relativamente suaves ao nível da transição entre intensidades de pixels vizinhos esta redução de tamanho não acarreta erros significativos. A partir destas imagens é então possível de obter a curva de calibração relacionando concentrações de CBD-FITC com intensidades na imagem. Para o efeito foi utilizada uma função polinomial de ordem 2, para um modelo final de escala 1/5 (260x206 pixels) em relação às imagens originais. Finalmente o modelo com os coeficientes do polinómio a um dado tempo de captura de imagem é gravado em formato próprio de *Matlab* com vista a poder ser utilizado pela segunda sub-rotina.

O primeiro passo da sub-rotina de determinação da concentração de CBD-FITC em fibras de celulose consiste na aquisição da imagem das fibras (ver figura 1) e escolha do modelo da curva de calibração referente ao tempo de captura. Deve ser também referido que no decurso da aquisição das imagens das fibras se teve o cuidado utilizar tempos de captura utilizados

que potenciem a sensibilidade das imagens para os valores previstos de concentração e que, ao mesmo tempo, são os utilizados nos modelos de calibração. Seguidamente, e tal como na primeira sub-rotina, é efectuada a fusão dos 3 canais numa única imagem com base nos factores de sensibilidades. Mais uma vez, devido às restrições previamente mencionadas, o tamanho de cada imagem sofre uma redução, para 1/5 do seu tamanho original (260x206 pixels). De seguida o valor de intensidade de cada pixel na imagem das fibras é convertido no correspondente valor de concentração, através do modelo da curva de calibração para o tempo de captura em causa. Na segunda fase desta sub-rotina é requerido ao utilizador a escolha da(s) zona(s) da(s) fibra(s)-alvo para a determinação da concentração do CBD-FITC adsorvido. A média das concentrações de cada uma das regiões escolhida é então calculada e gravada em ficheiro de texto juntamente com os seguintes pontos cardeais: pixel inicial no eixo dos xx, pixel inicial no eixo dos yy, pixel final no eixo dos xx, pixel final no eixo dos yy.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o intuito de fundir as 3 imagens dos canais obtidas (I_R , I_G e I_B) numa única imagem de intensidade I tiveram de ser determinados os factores de sensibilidade de cada canal (f_R , f_G e f_B) que permitem maximizar a sensibilidade às variações da fluorescência em função do tempo de captura da imagem. Desde logo, foram eliminados as imagens para as quais se notou a saturação das mesmas em qualquer um dos canais, o que pode ser verificado pelo desvio a uma recta dos pontos referentes a concentrações mais elevadas. Como é notório na análise da figura 2, foi evidente que, para o tempo de aquisição de 3000 ms a partir de uma concentração de 300 mg/mL, o canal *Green* ficou saturado uma vez que o desvio a uma recta para este canal é perfeitamente claro. Verificou-se também que para todos os tempos de captura abaixo do limiar de saturação da imagem e todas as concentrações acima de 10% do limiar de saturação da imagem (valor de 256), a sensibilidade referente a cada canal tendia para um valor constante e praticamente independente da concentração de CBD-FITC bem como do tempo de aquisição. Deste modo, apenas com um pequeno acerto através da determinação das médias dos valores assintóticos para cada tempo de captura foi possível de obter os factores de sensibilidade de cada canal que permitem maximizar a sensibilidade às variações da fluorescência. Estes encontram-se descritos na tabela 1 e, pela sua análise da tabela, pode-se concluir que, os factores calculados se mostraram bastante próximos para as gamas de tempos e concentrações validadas. Os valores médios dos factores de sensibilidade, determinados para cada um dos canais, foram, assim, de 0.248 para o canal *Red*, 0.649 para o canal *Green* e 0.104 para o canal *Blue*. A expressão para a determinação da imagem de intensidades final adquiriu assim a seguinte forma: $I = 0.248 \times I_R + 0.649 \times I_G + 0.104 \times I_B$.

Pela análise destes dados, é possível de ser determinada a gama de tempos de captura adequada para cada concentração de CBD-FITC nas amostras de calibração de concentração conhecida, o que permite reduzir significativamente a quantidade de imagens a diferentes tempos de captura que é necessário adquirir. Este facto deriva de que apenas as imagens com factores de sensibilidade constantes são indicadas eliminando tempos de captura muito elevados (saturação da imagem) ou demasiado baixos (fora da zona linear dos factores de sensibilidade).

Pela análise dos resultados obtidos para os diversos tempos de aquisição, verificou-se que para o tempo de 1000 ms, se obteve uma das melhores relações para a abrangência de concentrações com factores de sensibilidade constantes. Por essa razão, encontra-se representado, na figura 3, o modelo da curva de calibração relacionando a intensidade medida com a posição na imagem e a concentração de CBD-FITC.

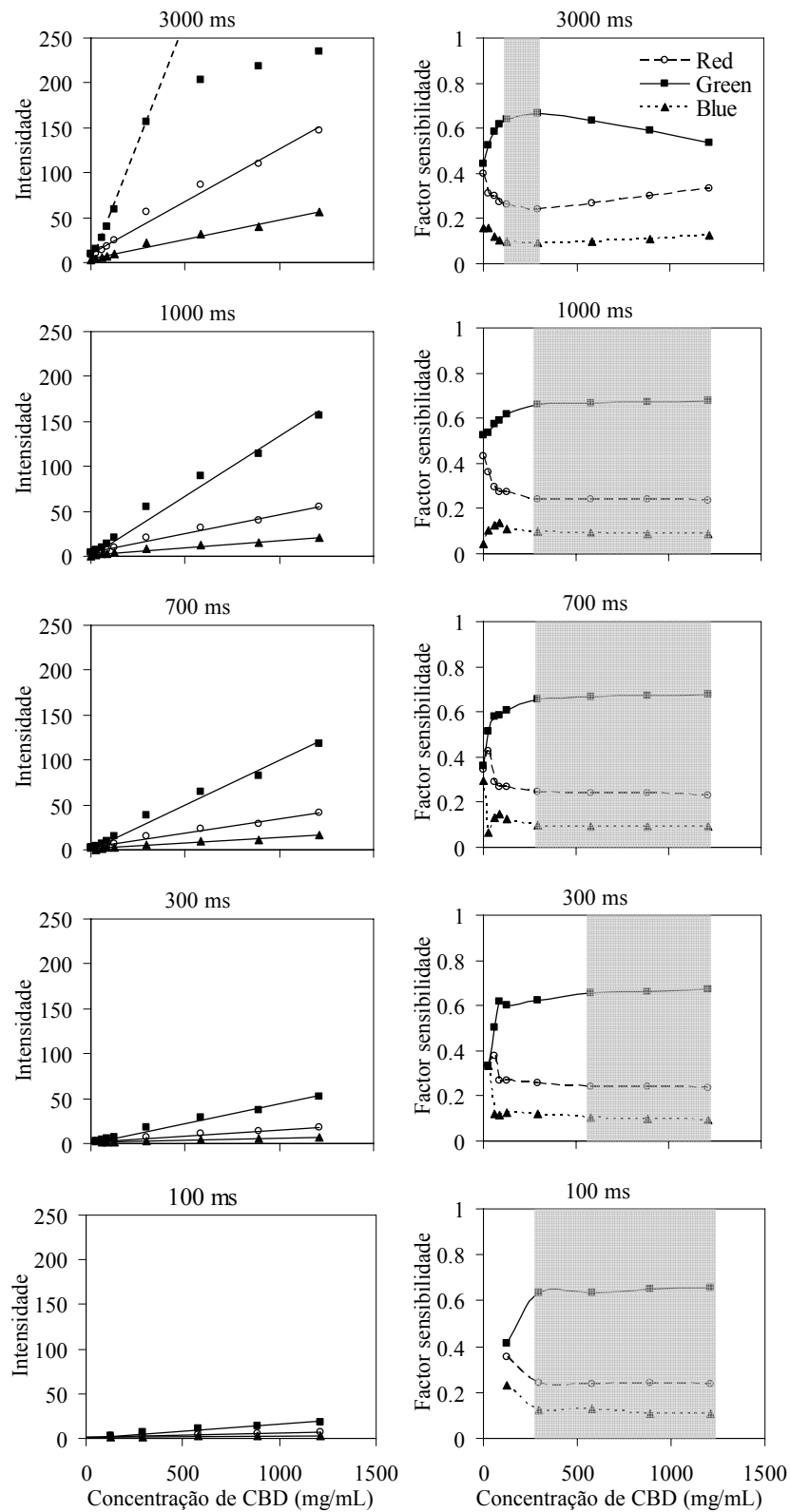


Figura 2 - Variação da intensidade e dos factores de sensibilidade com a concentração em CBD para os tempos de captura de imagem estudados (zona sombreada representa os valores utilizados para o cálculo dos factores de sensibilidade).

Como se pode aferir pela análise da figura 3, existe uma grande diferença, em termos de intensidade medida, consoante a localização de um ponto na imagem, para qualquer concentração. Isto é devido ao facto de haver, para qualquer caso, uma dispersão (ainda que

possa ser pequena) de origem circular, estendendo-se a partir do ponto de focagem do feixe de luz. No caso concreto, além da dispersão não ser de todo negligenciável, nota-se claramente que o ponto de focagem não se encontra centrado na imagem, encontrando-se ao invés muito mais próximo do início da imagem em termos do eixo dos xx. No caso concreto da imagem em causa é também patente a proporcionalidade do incremento da intensidade medida com o aumento da concentração, principalmente para valores de concentração superiores a 200 mg/mL. Este facto, aliado à intensidade que, para todos os valores de concentração, se encontra distante dos valores de saturação, implica ser o tempo de 1000 ms razoável para a obtenção de imagens de calibração assim como de fibras que se estime estarem dentro das concentrações utilizadas (até 1210 mg/mL de CBD-FITC).

Tabela 1 - Valores dos factores de sensibilidade para cada canal em função do tempo de captura de imagem e média geral.

Tempo (ms)	f_R	f_G	f_B
3000	0.251	0.653	0.0957
1000	0.246	0.659	0.0952
700	0.244	0.655	0.100
300	0.252	0.638	0.110
100	0.239	0.645	0.116
Média	0.248	0.649	0.104

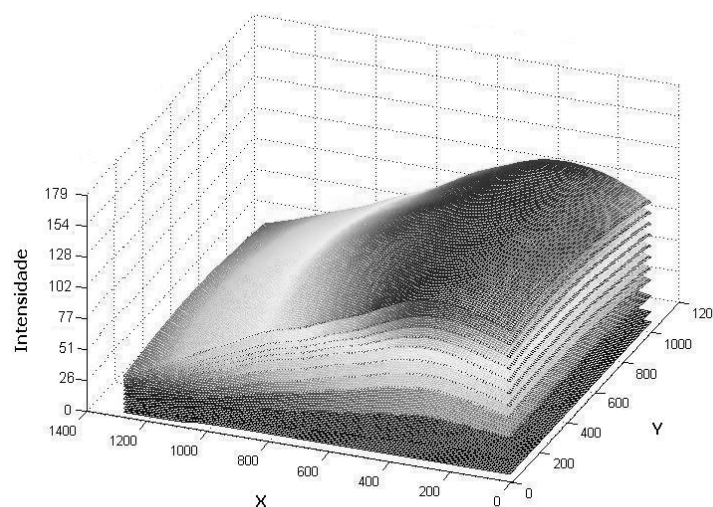


Figura 3 - Modelo da curva de calibração para um tempo de captura de imagem de 1000 ms (cada superfície representa uma concentração específica de CBD-FITC).

Com o intuito de provar que o valor da intensidade de cor recebido pela câmara de aquisição de imagem é proporcional a toda a quantidade de CBD-FITC existente numa dada amostra foi ainda efectuado um ensaio comparativo de 3 alturas de líquido de uma mesma concentração e foi verificado que a intensidade adquirida foi proporcional à altura do líquido e consequentemente à quantidade de CBD-FITC.

Os resultados provisórios obtidos apontam para uma adsorção de $15-25 \times 10^{-13} \text{ mol}_{\text{CBD}}/\text{mm}^2$ para as fibras *CF11* da *Whatman* (celulose pura) saturadas com CBD, e de $4-8 \times 10^{-13} \text{ mol}_{\text{CBD}}/\text{mm}^2$ para as fibras secundárias, à concentração utilizada nos ensaios de Pala *et al.* (2001). Estes valores correspondem a um número de camadas de adsorção de 3-8 para a celulose pura e de 2 a 6 para as fibras secundárias, uma vez que o valor medido por análise de imagem reporta-se à soma da área projectada de ambos os lados das fibras. O facto de se

obterem valores elevados pode indiciar uma elevada irregularidade na superfície das fibras, uma vez que a área superficial das fibras tenderia a ser maior do que o valor da área projectada nas imagens, a par de um certo enrolamento (visível) das fibras sobre si mesmas. Este facto implica que a intensidade acumulada poderá provir não de apenas duas faces da fibra mas até de 4 faces em alguns locais. Consequentemente, a área disponível para a adsorção seria superior à utilizada no cálculo do número de camadas de adsorção anterior, implicando deste modo, um menor número de camadas de adsorção dos que as descritas anteriormente. Uma vez que se tratam, ainda, de dados provisórios, e um estudo mais completo se encontra em curso, nomeadamente ao nível de um método alternativo de calibração, não é, neste momento, lícito o retirar de mais conclusões.

CONCLUSÕES

Verificou-se que para todos os tempos de captura abaixo do limiar de saturação da imagem e todas as concentrações acima de 10% do limiar de saturação da imagem os valores da sensibilidade de cada canal tendiam para um valor constante de 0.248 para o canal *Red*, 0.649 para o canal *Green* e 0.104 para o canal *Blue*. Estes valores, foram substituídos na expressão para a determinação da imagem de intensidades final que adquiriu assim a seguinte forma: $I = 0.248 \times I_R + 0.649 \times I_G + 0.104 \times I_B$. Verificou-se também, ser possível de determinar a gama de tempos de captura adequada para cada concentração de CBD-FITC quer nas amostras de calibração de concentração conhecida quer para as imagens das fibras. Deste modo foi patente que para o tempo de 1000 ms, se obteve uma das melhores relações para a abrangência de concentrações com factores de sensibilidade constantes e, consequentemente, este poderá ser utilizado na maioria dos ensaios até uma concentração de 1210 mg/mL de CBD-FITC.

Relativamente aos resultados provisórios obtidos foi notória uma elevada concentração de CBD na superfície das fibras o que pode ser devido a uma elevada irregularidade na superfície das fibras e ao enrolamento das mesmas resultando numa área superficial das fibras muito superior ao valor da área projectada nas imagens. De referir, contudo, que se tratam apenas de dados provisórios, e que um estudo mais completo se encontra em curso, não sendo, neste momento, lícito retirar mais conclusões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Black, G. W.; Rixon, J. E.; Clarke, J. H.; Hazlewood, G. P.; Ferreira, L. M. A.; Bolam, D. N. e Gilbert, H. J. (1997), Cellulose binding domains and linker sequences potentiate the activity of hemicellulases against complex substrates. *Journal of Biotechnology*, v. 57, p. 59-69.
- Levy, I. (2001), Expression, refolding and indirect immobilization of horseradish peroxidase (HRP) to cellulose via a phage-selected peptide and cellulose-binding domain (CBD). *Journal of Peptide Science*, v. 7, n. 1, p. 50-57.
- Mattinen M.-L.; Linder M.; Teleman A. e Annala A. (1997), Interaction between cellohexaose and cellulose binding domains from *Trichoderma reesei* cellulases. *FEBS Letters*, v. 407, p. 291-296.
- Pala, H.; Lemos, M. A.; Mota, M. e Gama, F. M. (2001), Enzymatic upgrade of old paperboard containers. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, p. 274-279.
- Srisodsuk M.; Reinikainen T.; Pentillä M. e Teeri T.T. (1993), Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline Cellulose. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 20756-20761.
- Wierzba, A.; Reichl, U.; Turner, R.F.B.; Warren, R.A.J. e G. Kilburn, D.G. (1995), Adhesion of mammalian cells to a recombinant attachment factor, CBD/RGD, analyzed by image analysis. *Biotechnology & Bioengineering*, v. 46, n. 3, p. 185-193.