

**Marco António Ricardo Alves**

**Desenvolvimento de um método de análise  
quantitativa de concentração celular e PHB por  
microscopia de fluorescência e análise de imagem**

**Lisboa  
2009**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

**Departamento de Química**

**Desenvolvimento de um método de análise quantitativa de  
concentração celular e PHB por microscopia de fluorescência e  
análise de imagem.**

Marco António Ricardo Alves

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova  
de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador:  
Professor Doutor Mário Eusébio

**Lisboa**  
**2009**



*Aos meus pais, José e Custódia, ao mano  
Jorge, ao avô Joaquim e à minha princesa Sara  
simplesmente por tudo!*



## Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Professor Mário Eusébio por toda a ajuda, motivação, disponibilidade, compreensão, orientação e aconselhamento, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

Um agradecimento muito grande para a Joana Pais e para a Inês Farinha pela infinita paciência e disponibilidade que demonstram ao longo de todo o trabalho, acudindo a todos os meus problemas ou questões.

Um obrigado para a Professora Luísa Serafim e o Professor Paulo Lemos pela sua ajuda, aconselhamento e disponibilidade sempre que necessário.

Quero agradecer também à Professora Ascensão Reis pelo aconselhamento precioso e certo.

Um grande obrigado para os colegas dos laboratórios 608 e 610 por toda a simpatia e auxílio.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer à minha família, à minha namorada Sara e a todos os meus amigos pela paciência, carinho e motivação que demonstraram ao longo de todo o tempo que o trabalho demorou a fazer e que tornaram tudo muito mais fácil.



## Resumo

O objectivo principal deste trabalho é o desenvolvimento de uma técnica de análise de imagem que permita a determinação da concentração celular e da concentração de PHB em amostras retiradas de fermentações experimentais para produção de PHB com culturas puras de *E.coli* recombinante.

Foram estudados vários métodos de conservação das células e, também, a sua influência na qualidade das imagens obtidas. O método de conservação que apresentou melhores resultados foi a fixação das amostras com 5% final de formaldeído.

Determinou-se ainda que uma concentração de *DAPI* de 10  $\mu\text{g/ml}$  era adequada para obter imagens com boa qualidade e desenvolveu-se com sucesso um método de *double-staining* com *DAPI* e Azul de Nilo para determinar a concentração de biopolímero através de análise de imagem sem ser necessário recorrer a pares de amostras.

Foi desenvolvido um método de análise de imagem baseado na aplicação *CellC*, escrita em linguagem *MatLab*, para determinar a concentração celular e a concentração volumétrica de biopolímero através de análise de imagem, sendo monitorizadas cinco fermentações para desenvolver e testar o método.

Determinou-se ainda que não existe uma relação linear entre o número de diluições prévias a fazer às amostras, de forma a obter um número razoável de células por campo, e os valores de densidade óptica a 600<sub>nm</sub> e de peso seco, sendo que, no entanto, para determinadas gamas destes valores se observou uma relação logarítmica. A relação observada foi utilizada em experiências posteriores e permitiu uma diluição adequada das amostras.

Verificou-se que para a determinação da concentração celular através de análise de imagem, a evolução da concentração celular ao longo do tempo foi semelhante aos resultados obtidos através de medidas de densidade óptica a 600<sub>nm</sub> e pesos secos.

Os resultados obtidos para a concentração de PHB após análise de imagem comportaram-se de forma semelhante aos obtidos através de cromatografia gasosa, demonstrando que o método desenvolvido pode ser utilizado para quantificação volumétrica do biopolímero.

Em suma, neste trabalho desenvolveu-se com sucesso uma técnica de análise de imagem que permite determinar as concentrações celular e volumétrica de biopolímero, tendo em vista os propósitos inicialmente estabelecidos.



## Abstract

The main objective of this work is the development of an image analysis technique with the purpose of measuring the cellular concentration and the concentration of PHB in samples of experimental fermentations aimed to PHB production, with pure cultures of recombinant *E. coli*.

Several methods of conservation of the cells and also their influence in the quality of the obtained images were studied. The method of conservation that presented better results was the fixation of the samples with 5% final of formaldehyde.

It was determined that a concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$  of DAPI was adequate for obtain images with good quality and it was also successfully developed an approach of double-staining with DAPI and Nile Blue in order to determinate the concentration of biopolymer through image analysis without the need of sample pairs.

It was developed an image analysis approach with the application CellC, written in language MatLab, for the determination of the cellular and biopolymer concentrations and the concentration of biopolymer. Five fermentations were monitored in order to develop and test the method.

It was determined that it does not exists a linear relation between the number of needed dilutions of the samples, in order to achieve a reasonable number of cells per microscopic field, with the values of optical density at 600<sub>nm</sub> and of dry weight. However, for determined ranges of these values it was observed a logarithmic relation. This relation was used in later experiments and resulted in the adequate dilution of the samples.

It was verified for the determination of the cellular concentration through image analysis, that the evolution of the cellular concentration along the time was similar to the results obtained by measures of optical density at 600<sub>nm</sub> and dry weights.

The results obtained for the concentration of PHB after image analysis behaved similarly with those obtained through gas chromatography, showing that the approach developed can be utilized for volumetric biopolymer quantification.

In sum, in this work it was successfully developed an image analysis technique to determinate the cellular and volumetric biopolymer concentrations, having in mind the purposes initially established.



## Nomenclatura

<i>CDW</i>	Peso seco (g/l) (do inglês <i>Cell Dry Weight</i> )
[Cel]	Concentração celular (n.º cel/ml)
DO <sub>600nm</sub>	Densidade Óptica a 600nm
n	Número de células por campo de observação
[PHB]	Concentração de PHB (g/l)
%PHB (p/p)	Percentagem mássica de PHB
%PHB (v/v)	Percentagem volumétrica de PHB



## Abreviaturas

<i>ASCII</i>	do inglês <i>American Standard Code for Information Interchange</i>
<i>bmp</i>	Formato de imagem <i>Windows Bitmap</i>
<i>CCD</i>	Câmara de vídeo analógica monocromática (do inglês <i>Charged-Coupled Device</i> )
<i>CMYK</i>	do inglês <i>Cyan, Magenta, Yellow and Key (Black)</i>
<i>CSV</i>	Ficheiro de valores separados por vírgulas (do inglês <i>Comma-Separated Values</i> )
<i>DAPI</i>	do inglês <i>4'-6-Diamidino-2-phenylindole</i>
<i>DNA</i>	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Desoxirribonucleic Acid</i> )
<i>FISH</i>	<i>Fluorescent in situ Hybridization</i>
<i>GC</i>	do inglês <i>Gas Chromatography</i>
<i>gif</i>	Formato de imagem <i>CompuServe Bitmap</i>
<i>HSI/V</i>	do inglês <i>Hue, Saturation and Intensity/Value</i>
<i>Jpg/jpeg</i>	Formato de imagem <i>Joint Photographic Experts Group</i>
<i>PBS</i>	Tampão fosfato (do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
<i>PHA's</i>	Polihidroxialcanoatos
<i>PHB's/P(3HB)</i>	Polihidroxibutiratos
<i>rRNA</i>	Ácido ribonucleico ribossomal (do inglês <i>ribossomal ribonucleic acid</i> )
<i>RGB</i>	do inglês <i>Red, Green and Blue</i>
<i>Rpm</i>	Rotações por minuto
<i>Tiff</i>	Formato de imagem <i>Tagged Image File Format</i>



## Índice de Matérias

Resumo .....	i
Abstract.....	iii
Nomenclatura .....	v
Abreviaturas.....	vii
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tabelas .....	xv
1. Introdução geral.....	1
1.1. Relevância do estudo e objectivos.....	1
1.2. Biopolímeros como substitutos dos polímeros sintéticos - Polihidroxialcanoatos .....	3
1.3. Microscopia de fluorescência.....	5
1.4. Análise de imagem – aquisição, processamento e análise de imagem .....	8
2. Materiais e Métodos .....	11
2.1. Fermentações e determinação de peso seco, densidade óptica e concentração de PHB .....	11
2.1.1. Fermentações.....	11
2.1.2. Amostragem .....	12
2.1.3. Determinação de peso seco e densidade óptica a 600 nm.....	13
2.1.4. Determinação de concentração de PHB .....	13
2.2. Análise das condições de utilização dos corantes.....	14
2.2.1. Determinação da concentração óptima de <i>DAPI</i> .....	14
2.2.2. Análise das condições de realização de <i>double-staining</i> com <i>DAPI</i> e Azul de Nilo .....	15
2.3. Fixação das Amostras .....	17
2.3.1. Análise da eficiência dos métodos de fixação.....	18
2.4. Desenvolvimento do método de análise de imagem.....	19

2.4.1.	A aplicação <i>CellC</i> .....	19
2.4.2.	Determinação da concentração celular através de análise de imagem .....	29
2.4.3.	Determinação da curva de calibração do número óptimo de diluições em função da densidade óptica e do peso seco. ....	29
2.4.4.	Determinação da concentração de PHB através de análise de Imagem.....	30
2.4.5.	Caracterização das células através de análise de imagem.....	31
3.	Resultados e Discussão .....	33
3.1.	Análise das condições de utilização dos corantes.....	33
3.1.1.	Determinação da concentração óptima de <i>DAPI</i> .....	33
3.1.2.	Análise das condições de realização de <i>double-staining</i> com <i>DAPI</i> e Azul De Nilo .....	33
3.2.	Análise da eficiência dos métodos de fixação.....	37
3.3.	Desenvolvimento do método de análise de imagem.....	43
3.3.1.	A aplicação <i>CellC</i> – Resultados da segmentação de imagem.....	43
3.3.2.	Determinação da curva de calibração do número óptimo de diluições em função da densidade óptica e do peso seco. ....	50
3.3.3.	Determinação da concentração celular através de análise de imagem .....	54
3.3.4.	Determinação da concentração de PHB através de análise de imagem.....	60
3.3.5.	Caracterização das células através de análise de imagem.....	63
4.	Conclusões.....	67
5.	Perspectivas Futuras .....	71
6.	Bibliografia .....	73
	Anexos.....	I

## Índice de Figuras

Figura 1.1 - Fórmula geral dos PHA's .....	4
Figura 1.2 - Esquema do funcionamento de um microscópio de epifluorescência.....	6
Figura 1.3 - Funcionamento do transporte de informação de um fotossensor de uma câmara CCD. ....	9
Figura 2.1 - Montagem experimental utilizada nas experiências 1, 2, 3 e 5 .....	12
Figura 2.2 - Microscópio Olympus BX51 e respectiva lâmpada, utilizado para a visualização de todas as amostras. ....	15
Figura 2.3 - Filtro metálico utilizado como suporte para a filtração em membranas de policarbonato das amostras coradas com Azul de Nilo .....	17
Figura 2.4 - Aspecto da interface gráfica da aplicação <i>CellC</i> .....	20
Figura 2.5 - Representação do algoritmo de segmentação de imagem utilizado na aplicação <i>CellC</i> .....	22
Figura 2.6 – Exemplificação dos processos de dilatação e erosão em matrizes binárias..	23
Figura 2.7 – Exemplificação dos processos de dilatação, erosão, abertura, fecho, transformação <i>top-hat</i> e <i>bottom-hat</i> .....	24
Figura 2.8 – Exemplificação do processo de realce de contraste. ....	25
Figura 2.9- Resultado da limiarização automática, pelo método de <i>Otsu</i> , na aplicação <i>CellC</i> .....	26
Figura 2.10 - Eliminação de todos os objectos fronteiros da imagem após limiarização (Figura 2.9). ....	27
Figura 2.11 - Resultado final de uma análise de imagem para contagem de células na aplicação <i>CellC</i> .....	28
Figura 3.1 – Resultados do teste da concentração de <i>DAPI</i> em amostras fixas com 5% de formaldeído.....	33
Figura 3.2 – Resultados do teste de incubação das amostras com <i>DAPI</i> a 56°C.....	34
Figura 3.3 - Resultados obtidos após incubação simultânea com <i>DAPI</i> e Azul de Nilo; (a) biopolímero com Azul de Nilo, (b) restante conteúdo da célula com <i>DAPI</i> .....	34
Figura 3.4 - Resultados das observações de amostras coradas simultaneamente com Azul de Nilo (a) e <i>DAPI</i> (b), após incubação sucessiva. ....	35
Figura 3.5 - Resultados das observações de amostras coradas simultaneamente com Azul de Nilo (a) e <i>DAPI</i> (b), após incubação simultânea. ....	35
Figura 3.6 – Resultados para as amostras fixas com etanol e formaldeído, após lavagem e ressuspensão com <i>PBS</i> . ....	37

Figura 3.7 - Resultados para as amostras conservadas com 20% de glicerol, após lavagem e ressuspensão com <i>PBS</i> . .....	38
Figura 3.8 – Resultados para as amostras conservadas com 20% de glicerol, sem lavagem nem ressuspensão.....	39
Figura 3.9 – Resultados para as amostras fixas com 5% de formaldeído, sem lavagem nem ressuspensão.....	40
Figura 3.10 – Resultados da observação após filtração em membranas de policarbonato das amostras conservadas com 20% de glicerol coradas com <i>DAPI</i> .....	41
Figura 3.11 – Resultados da observação após filtração em membranas de policarbonato das amostras fixas com 5% de formaldeído coradas com <i>DAPI</i> .....	41
Figura 3.12 – Resultados para as amostras fixas com 5% de formaldeído observadas sem filtração, .....	42
Figura 3.13 - Imagem contendo células coradas com <i>DAPI</i> (a) e resultado da sua segmentação (b) na aplicação <i>CellC</i> , para uma amostra com baixa concentração de biopolímero (amostra 1 da experiência 2 contendo 17% p/p de PHB). .....	44
Figura 3.14 - Imagem contendo células coradas com <i>DAPI</i> (a) e resultado da sua segmentação (b) na aplicação <i>CellC</i> , para uma amostra com maior concentração de biopolímero (amostra 7 da experiência 2 contendo 25% p/p de PHB). .....	45
Figura 3.15 - Variação dos resultados obtidos para a contagem de células consoante os valores dos parâmetros de divisão de agregados e de remoção de ruído .....	47
Figura 3.16 –Exemplo da variação dos resultados obtidos para a contagem de células consoante os valores dos parâmetros de divisão de agregados e de remoção de ruído. ....	48
Figura 3.17 - Aspecto da imagem obtida (c) após a soma da imagem relativa ao biopolímero (a) e da imagem relativa ao resto do conteúdo celular (b).....	49
Figura 3.18 – Detalhes da Figura 3.17 em que se evidencia o processo da soma das imagens relativas ao biopolímero (1 e 4) com as imagens que contêm o restante conteúdo celular (2 e 5) e o resultado dessa soma (3 e 6).....	49
Figura 3.19 – Número de diluições a fazer em função de $DO_{600nm}$ para a totalidade das amostras das experiências 2. ....	51
Figura 3.20 - Curva de calibração de diluições a partir de $DO_{600nm}$ para a totalidade das amostras das experiências 3 e respectiva regressão logarítmica. ....	51
Figura 3.21 – Número de diluições a fazer em função de $DO_{600nm}$ para a totalidade das amostras das experiências 2 e 3. ....	52
Figura 3.22 - Regressão logarítmica aos primeiros pontos da curva de calibração de diluições a partir de $DO_{600nm}$ (Figura 3.21). ....	53

Figura 3.23 - Regressão linear aos primeiros pontos da curva de calibração de diluições a partir de $DO_{600nm}$ (Figura 3.21). .....	53
Figura 3.24 - Variação da concentração celular ao longo do tempo para a experiência 2. ....	55
Figura 3.25 - Variação da concentração celular ao longo do tempo para a experiência 3. ....	55
Figura 3.26 - Variação de $\ln(CDW)$ , $\ln(DO_{600nm})$ e $\ln([Cel])$ ao longo do tempo para a experiência 2. ....	56
Figura 3.27 - Variação de $\ln(CDW)$ , $\ln(DO_{600nm})$ e $\ln([Cel])$ ao longo do tempo para a experiência 3. ....	57
Figura 3.28 – Resultados das observações realizadas a amostras da experiência 5. ....	59
Figura 3.29 - Resultados das observações realizadas a amostras da experiência 4. ....	59
Figura 3.30 - Variação da concentração volumétrica de PHB, determinada por análise de imagem, ao longo do tempo para a experiência 2. ....	60
Figura 3.31 - Variação da concentração volumétrica de PHB, determinada por análise de imagem, ao longo do tempo para a experiência 3. ....	61
Figura 3.32 - Variação das concentrações volumétrica e mássica de PHB ao longo do tempo para a experiência 2. ....	62
Figura 3.33 - Variação das concentrações volumétrica e mássica de PHB ao longo do tempo para a experiência 3. ....	62
Figura 3.34 - Variação do volume celular médio, $CDW$ e concentração celular ao longo do tempo para as amostras da experiência 2. ....	64
Figura 3.35 - Variação do volume celular médio, $CDW$ e concentração celular ao longo do tempo para as amostras da experiência 3. ....	65
Figura 3.36 - Variação da % mássica de PHB em função do volume celular médio para a experiência 2. ....	65
Figura 3.37 - Variação da % mássica de PHB em função do volume celular médio para a experiência 3. ....	66



## Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Condições das experiências de fermentação.....	11
Tabela 3.1 - Concentração celular determinada através de análise de imagem, para as experiências 2 e 3.....	54
Tabela 3.2 - Resultados da caracterização das células através de análise de imagem. ...	63
Tabela A.1- Dados da experiência 1.....	I
Tabela A.2 - Dados da experiência 2.....	II
Tabela A.3 - Dados da experiência 3.....	III
Tabela A.4 – Dados da experiência 4. ....	IV
Tabela A.5 - Dados da experiência 5.....	V



# 1. Introdução geral

## 1.1. Relevância do estudo e objectivos

Este trabalho surge devido à necessidade de desenvolver um método alternativo, rápido e eficaz para determinar a concentração celular e, principalmente, a concentração de biopolímero intracelular em amostras de culturas bacterianas desenvolvidas com o intuito de produzirem biopolímero.

Actualmente, existem diversos métodos para acompanhar a acumulação em microrganismos de polihidroxialcanoatos (PHA's), a família de biopolímeros em questão neste trabalho, sendo que se podem destacar a análise através de cromatografia gasosa (Braunegg et al., 1978; Comeau et al., 1988), o método do hipoclorito e a utilização de espectroscopia de infravermelho (Wendlandt et al., 2005). No entanto, estes últimos dois métodos, apesar de rápidos e permitirem bons resultados, dependem de uma calibração prévia feita através de cromatografia gasosa. Dado que a análise das amostras por este método envolve algum gasto de tempo e material e que, por vezes, é necessário esperar para utilizar os equipamentos que permitem essa análise, faz sentido procurar e desenvolver métodos alternativos que permitam efectuar a análise de forma mais rápida e simples (Wendlandt et al., 2005).

A análise de imagem tem sido aplicada ao nível da quantificação e caracterização de células há já algum tempo. Uma das primeiras referências que aparece na literatura é o trabalho de (Hobbie et al., 1977), em que, pela primeira vez, são utilizados filtros Nuclepore para reter as células coradas com Alaranjado de Acridina. Algum tempo depois surge um dos trabalhos pioneiros na utilização de *DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole)* para corar células (Porter and Feig, 1980), de forma a permitir a sua identificação e a sua contabilização. É ainda nesta altura que surgem também trabalhos que procuram analisar e validar estatisticamente os métodos de contabilização de células através de análise de imagem (Kirchman et al., 1982). Ainda na década de 80, aplicam-se pela primeira vez este tipo de técnicas na investigação de contaminação de alimentos por microrganismos (Pettipher and Rodrigues, 1982), surgem os primeiros estudos acerca da caracterização das células através de análise de imagem (Bratbak, 1985), e surgem também os primeiros trabalhos que envolvem o processamento digital das imagens obtidas (Bjornsen, 1986; Sieracki et al., 1985). Após esta era de inovações, nos anos seguintes os trabalhos incidiram principalmente na tentativa de desenvolver algoritmos mais potentes para o processamento de imagens aproveitando o aumento significativo da capacidade dos computadores, e também a diminuição dos seus custos (Bloem et al., 1995;

Sieracki et al., 1989a; Sieracki et al., 1989b). O aproveitamento dessas novas capacidades de processamento permitiu que a análise de imagem fosse utilizada de forma mais aprofundada, e em mais áreas, como por exemplo, na análise fisiológica de populações de microrganismos (Pons et al., 1998), ou na caracterização de lamas activadas (da Motta et al., 2001). Entretanto com o aparecimento de técnicas de *FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)* tornou-se possível analisar populações específicas de um conjunto de populações presente num determinado meio a estudar (Daims et al., 2001; Hug et al., 2005).

No que diz respeito à contabilização do conteúdo celular em biopolímeros intracelulares, as técnicas de análise de imagem não tiveram um grande desenvolvimento. No caso específico dos polihidroxialcanoatos, a análise de imagem foi principalmente utilizada para identificar populações acumuladoras de biopolímero (Onda et al., 2002; Oshiki et al., 2008), e também para estudar o processo de formação dos grânulos de biopolímero (Hermawan and Jendrossek, 2007). Os trabalhos de determinação dos conteúdos em polímero por meios alternativos à cromatografia gasosa focaram-se, principalmente, em técnicas envolvendo citometria de fluxo e espectrofluorometria (Degelau et al., 1995; Gorenflo et al., 1999; Kacmar et al., 2006), utilizando o corante Azul de Nilo como marcador fluorescente do biopolímero.

Desta forma, o objectivo principal deste trabalho é o desenvolvimento de uma técnica de análise de imagem que permita a determinação da concentração celular e da concentração de PHB's em amostras retiradas de fermentações experimentais para produção de PHB's com culturas puras de *E.coli* recombinante e, também a caracterização volumétrica das células.

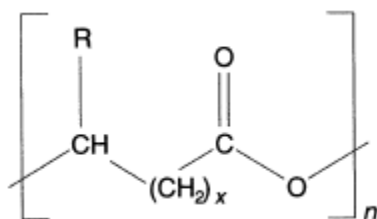
Para atingir este objectivo é necessário cumprir uma série de etapas intermédias imprescindíveis. A primeira dessas etapas é o estudo da viabilidade das estratégias de conservação e fixação das células. De seguida é necessário determinar qual a melhor abordagem em termos práticos no que diz respeito à preparação das amostras para análise ao microscópio. Nesta etapa, serão estudadas formas de recolher e imobilizar as células para a posterior observação, serão determinadas as condições necessárias para um coloração eficaz por parte dos corantes a utilizar e as diluições necessárias para obter imagens com um número adequado de células. Após estas etapas, passou-se efectivamente para a parte de análise de imagem onde foram testadas diversas soluções para chegar aos resultados pretendidos.

## 1.2. Biopolímeros como substitutos dos polímeros sintéticos - Polihidroxialcanoatos

Os plásticos, nas suas diversas formas, foram uma das maiores invenções da Humanidade, não só devido às suas propriedades que permitem, por exemplo, a coexistência de leveza, resistência e impermeabilidade no mesmo objecto, mas também porque têm hoje em dia uma importância inegável e decisiva no estilo de vida das pessoas. No entanto, os plásticos sintéticos não são degradáveis nem compatíveis com o ciclo biogeoquímico natural dos elementos. Estes problemas, aliados à emissão de compostos tóxicos aquando da incineração destes produtos, fazem com que surja a necessidade de os substituir por alternativas viáveis do ponto de vista ambiental e económico (Pandey, 2004). A utilização de polímeros que se degradam depois de usados é a melhor opção para combater estes problemas. Juntamente com a fotólise, a biodegradação é uma das principais formas através das quais os polímeros se podem decompor. A biodegradabilidade é definida como a capacidade que um composto tem em se decompor, principalmente em produtos inócuos, pela acção de organismos vivos, tais como microrganismos. Neste campo, as bactérias e os fungos são os principais intervenientes nos processos de biodegradação existentes no mundo natural. A decomposição desses materiais permite-lhes obter precursores para componentes celulares e a energia para os processos internos que a exigem. Desta forma, pode-se dizer que a biodegradação não é mais que catabolismo. Com a excepção dos recifes de coral e estruturas semelhantes, as entidades biológicas destroem rapidamente aquilo que produzem. Assim, produtos biodegradáveis são, geralmente, produtos sintetizados por entidades biológicas. Alguns polímeros sintéticos podem ser microbiologicamente degradados, no entanto esse processo é normalmente muito lento, e a maioria possui composições químicas resistentes a ataques enzimáticos. Isto já não acontece com os polímeros de origem biológica, muitos dos quais têm propriedades às dos polímeros sintéticos (Braunegg et al., 1998).

Um tipo muito importante de polímeros produzidos biologicamente e biodegradáveis são os polihidroxialcanoatos (Braunegg et al., 1998). Trata-se de uma família de poliésteres alifáticos produzidos por microrganismos, e que são completamente biodegradáveis. Estes polímeros oferecem uma gama vasta de propriedades físicas que vão desde produtos duros e quebradiços, até elastómeros. Um dos atractivos dos PHA's é o facto de poderem ser produzidos a partir de fontes de carbono renováveis, tais como açúcares e óleos vegetais (Platt and Rapra Technology Limited., 2006). Existe ainda a possibilidade de serem produzidos com resíduos provenientes de actividades agrícolas e industriais (Braunegg et al., 1998), tais como

soro de leite e melaços (Platt and Rapra Technology Limited., 2006). A fonte de carbono disponível é um dos factores que determina o tipo de PHA produzido, e tem um peso significativo no custo final do produto. Desta forma, a fonte de carbono é um dos componentes mais importantes na produção de PHA e a principal variável passível de ser manipulada tendo em vista redução dos custos de produção. Os PHA's são essencialmente compostos por monómeros de ácido R-(-)-3-hidroxiácidos (Figura 1.1).



**Figura 1.1 - Fórmula geral dos PHA's (Braunegg et al., 1998)**

Existem diferentes tipos de PHA's, que se distinguem pelo tamanho da cadeia, tipo de grupo funcional e pelo grau de ligações insaturadas.

O poli-3-hidroxi-butarato (PHB ou P(3HB)) é tipo mais comum de PHA produzido e é um exemplo de um homopolímero de cadeia curta. As propriedades físicas deste homopolímero não permitem que tenha um valor comercial assinalável, dado que é rígido, quebradiço e de difícil processamento. Desta forma, o interesse está orientado para a pesquisa e produção de heteropolímeros cujas características permitam aplicações comerciais mais vastas, dos quais se pode destacar o P(3HB-co-3HV) em que são incorporadas unidades de ácido 3-hidroxi-valérico (3HV) e outros ácidos em menores quantidades (Braunegg et al., 1998; Platt and Rapra Technology Limited., 2006). Além de ser completamente biodegradável, o PHB é um polímero biocompatível, sendo que se trata de um metabolito normalmente presente no sangue (Platt and Rapra Technology Limited., 2006).

O PHB é sintetizado biologicamente, e as bactérias são o meio mais comum para a sua produção. A biossíntese e a acumulação de polímero são despoletadas quando as células são sujeitas a uma pressão externa, como por exemplo, a falta de azoto ou oxigénio. Nestas condições, as células preparam-se para enfrentar as adversidades sintetizando PHB como fonte de carbono e reserva. De forma a otimizar a produção destes polímeros, usou-se a engenharia genética para criar micróbios recombinantes (Pandey, 2004). Um dos organismos mais estudados nesse sentido é a *Escherichia coli* recombinante, que é considerada um dos principais candidatos para a produção industrial de PHB, devido, principalmente, à sua elevada capacidade para acumular PHB (Tyo et al., 2006). Esses estudos têm tido em especial atenção a

utilização de diferentes fontes de carbono (Braunegg et al., 1998; Fonseca and Antonio, 2006; Fonseca et al., 2008; Lee et al., 1997; Nikel et al., 2006; Pisco et al., 2009), o tipo de alimentação do bioreactor e as condições de produção (Ahn et al., 2001; Braunegg et al., 1998; Lemos et al., 2006; Park et al., 2002; Serafim et al., 2008; Wong and Lee, 1998).

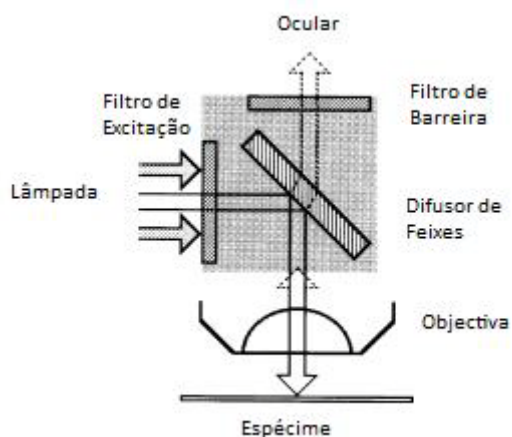
### **1.3. Microscopia de fluorescência**

Actualmente o termo microscopia engloba uma área tecnológica considerável e diversa, embora exista um ponto em comum, observar aquilo que de outro modo não seria possível. Inserida nessa área tecnológica está a microscopia de fluorescência, que é uma técnica com vasta utilização quer ao nível de investigação como a nível clínico (Harris et al., 2005).

Este tipo de microscopia baseia-se no fenómeno da fluorescência. Este fenómeno ocorre quando um átomo ou molécula, quando atingido por um quantum de radiação, sofre uma mudança na disposição dos electrões que rodeiam o núcleo. O electrão, ou electrões, em questão passa para um estado de maior energia e ao regressar a um estado de menor energia liberta energia sob a forma de calor e radiação. Como se produz calor, a radiação emitida é energeticamente mais fraca que a absorvida, tendo também, por isso, um comprimento de onda maior. Assim, quando uma radiação de comprimento de onda menor é direccionada para um corante com um fluorocrómo, este irá emitir radiação de um comprimento de onda maior e calor. Ao se bloquear a saída da radiação de excitação, a radiação emitida pelo fluorocrómo é isolada e detectada por nós no microscópio. Desta forma, é necessária a utilização de um sistema de iluminação que produza radiação de comprimentos de onda menores e de um sistema de detecção que detecte apenas os comprimentos de onda maiores que são produzidos. Geralmente o sistema de iluminação consiste em lâmpadas de mercúrio ou xénon. Para além desses dois sistemas é ainda necessária a existência de um filtro de excitação e de um filtro barreira. O filtro de excitação, ou filtro primário, transmite apenas radiação de menor comprimento de onda, ou seja, a radiação de excitação, enquanto que o filtro barreira, ou secundário, vai transmitir apenas a radiação de maior comprimento de onda, ou seja, a radiação de emissão. De forma a obter o melhor contraste possível, com objectos brilhantes devido á fluorescência e um fundo negro, é usual usarem-se condensadores de campo escuro (Harris et al., 2005).

Actualmente a maioria dos microscópios de fluorescência usam fluorescência epifluorescente. Nestes microscópios, a objectiva também funciona como condensador

transportando o feixe de excitação e também o feixe emitido. A parte do microscópio dedicada aos filtros inclui o filtro de excitação, o filtro barreira e um separador de feixes (Figura 1.2)(Harris et al., 2005).



**Figura 1.2 - Esquema do funcionamento de um microscópio de epifluorescência (adaptado de Harris (Harris et al., 2005)).**

A microscopia de fluorescência permite obter imagens que, após processamento e análise, tornam possível conhecer diversas propriedades das células, tais como o seu número, volume e características morfológicas (Daims and Wagner, 2007). Esta técnica começou por ser utilizada principalmente em estudos de ecologia marinha (Bjornsen, 1986; Porter and Feig, 1980), e em estudos relativos a contaminação de alimentos (Hermida et al., 2000; Rapposch et al., 2000). Entretanto, nos últimos anos surgiram alguns trabalhos em que se usou esta técnica para quantificação celular em bioreactores (Mesa et al., 2003; Solera et al., 2001).

A biomassa microbiana total numa amostra pode ser facilmente marcada usando um corante fluorescente genérico, que não seja específico para determinado organismo. Como exemplos desses corantes podem-se destacar o *DAPI* (*4'-6-Diamidino-2-phenylindole*), o alaranjado de Acridina e o *SYBR Green* (Daims and Wagner, 2007; Kepner and Pratt, 1994). O corante *DAPI* é um dos corantes genéricos mais usados. É um corante específico de *DNA* e tem um máximo de absorção de radiação próximo dos 360 nm e, quando ligado ao *DNA* tem um valor máximo de emissão próximo dos 460 nm (Ross et al., 1996). Quando não está ligado ou se liga a material que não o *DNA*, pode fluorescer com radiação amarela. Embora possa também ligar-se a grupos polifosfatos, o *DAPI* liga-se mais facilmente a sequências de *DNA* ricas em ligações A-T, com um valor mínimo para ligação de três pares A-T seguidos na cadeia de *DNA* (Kepner and Pratt, 1994).

Quando existe a necessidade de diferenciar populações específicas de entre um conjunto existente numa amostra, é necessário recorrer a técnicas que utilizem marcadores de elevada especificidade molecular. O método mais utilizado nestes casos é o método de “*fluorescent in situ hybridization*” (*FISH*) (Daims and Wagner, 2007). Neste método são usadas sondas de oligonucleótidos complementares de cadeias 16S ou 23S de *rRNA* (ácido ribonucleico ribossomal) específicas de certos grupos filogenéticos, e que são visíveis utilizando microscopia de fluorescência (DeLong et al., 1989). Dependendo do grau de conservação da sequência na sonda, relativamente ao *rRNA* alvo, o método *FISH* pode detectar desde espécies microbianas individualmente, ou detectar grupos filogenéticos maiores, tais como um género ou um filo (Amann et al., 1995).

Para além de ser possível detectar, quantificar e caracterizar células de uma forma geral, e populações específicas, é ainda possível, através da microscopia de fluorescência em conjunto com outros corantes fluorescentes, detectar organelos e inclusões intracelulares (Celis, 2006).

O Azul de Nilo A enquadra-se nesta gama de corantes. O Azul de Nilo A é uma oxazina básica que se converte por oxidação espontânea na oxazona fluorescente Vermelho de Nilo, quando em solução aquosa, sendo que se suspeita que é este último corante que é efectivamente responsável pela coloração dos grânulos de PHA. O Azul de Nilo A e o Vermelho de Nilo foram testados de forma positiva na coloração de bactérias acumuladoras de polihidroxialcanoatos, tais como a *Bacillus megaterium* e a *Azotobacter chroococcum*. Desta forma é possível observar a acumulação de PHA através de microscopia de fluorescência (Ostle and Holt, 1982). Os valores máximos de absorção e emissão do Azul de Nilo/Vermelho de Nilo quando ligados a lípidos são dependentes da hidrofobicidade do meio, sendo que o valor máximo de excitação se encontra no intervalo 500 – 600 nm e valor máximo de emissão no intervalo 600 – 660 nm (Betscheider and Jose, 2009; Mason, 1999).

É muito importante ter em conta no planeamento de experiências deste âmbito os componentes do microscópio, dado que é imprescindível que o sistema de iluminação e o de detecção sejam adequados aos fluorocromos dos corantes, assim como os filtros de excitação e barreira, sendo ainda indispensável a utilização de um óleo de imersão específico para a aplicação em causa (Madrid and Felice, 2005).

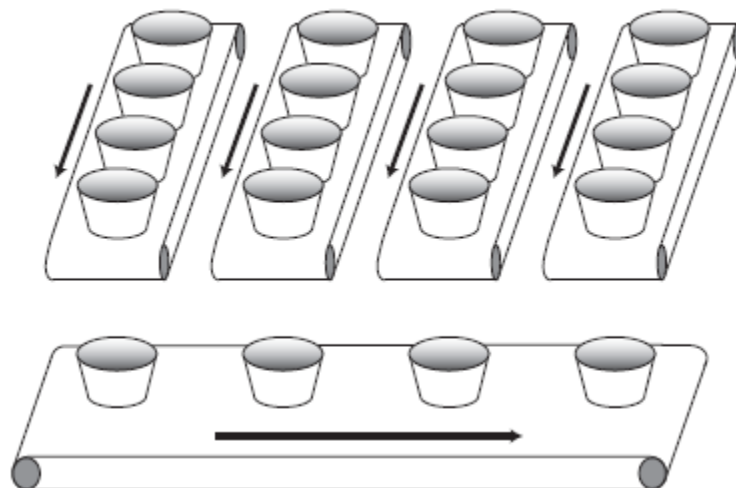
## 1.4. Análise de imagem - aquisição, processamento e análise de imagem

A análise de imagem é, hoje em dia, uma ferramenta bastante utilizada em associação com as técnicas de microscopia, dado que permite classificar e quantificar, de forma rotineira, automática e não subjectiva, os mais variados microrganismos. Nos últimos anos, verificou-se um aumento exponencial das capacidades dos computadores, bem como a diminuição do seu preço, pelo que a análise de imagem se estabeleceu, aos poucos, como uma rotina em várias aplicações de tecnologia celular. As aplicações mais comuns vão desde a enumeração de bactérias em alimentos sólidos, microscopia *in situ* para monitorização em linha de fermentações, análise de texturas de colónias, sequenciação do *DNA*, análise de resíduos de pólvora, determinação da biomassa, etc. (Borin et al., 2007; Daims and Wagner, 2007; Pandolfi et al., 2007; Vecht-Lifshitz and Ison, 1992).

O termo análise de imagem diz respeito, de uma maneira geral, não só à análise de imagem propriamente dita, como também aos processos prévios de captura e tratamento da imagem (Jähne, 2005; Russ, 2007).

Entre os métodos de aquisição de imagem mais utilizados incluem-se a câmara de vídeo acoplada a microscópio, densitómetros de varrimento laser, microscópios electrónicos ou mesmo por digitalização de fotografias. À excepção deste último, as imagens são adquiridas através de uma placa de aquisição de imagens instalada no computador.

A câmara de vídeo analógica monocromática *CCD* possui sensores que consistem num elevado número de elementos fotossensíveis. Estes, durante a fase de acumulação recebem cargas eléctricas provenientes dos fotões absorvidos, logo, proporcionais à iluminação. Estas cargas são então transportadas sequencialmente ao longo do *chip* de sensor a sensor e, finalmente, transformadas em diferenças de voltagem à saída (Figura 1.3) (Jähne, 2005).



**Figura 1.3 - Funcionamento do transporte de informação de um fotossensor de uma câmara CCD (retirado de Russ (Russ, 2007)).**

Através da placa de aquisição de imagens, a informação analógica, na forma de diferenças de voltagem é transformada em informação digital em que cada pixel corresponde a um espaço da imagem e possui um valor que corresponde à média desse espaço. O número de cores que uma imagem contém depende directamente do número de bits atribuído a cada pixel na representação digital. Para imagens em escala de cinzentos (ainda as mais vulgarmente utilizadas) é normal cada pixel ser representado por 8 bits (1 byte) a que correspondem 256 tons de cinzento. Os formatos de ficheiros de gravação mais comuns são o *tiff* (Tagged Image File Format), o *bmp* (Windows Bitmap), o *gif* (CompuServe Bitmap) e o *jpg* (Joint Photographic Experts Group). Para imagens a cores os formatos mais utilizados são o formato *RGB* (Red, Green e Blue), o *CMYK* (Cyan, Magenta, Yellow e black), ou o *HSI/V* (Hue, Saturation e Intensity/Value). Assim, cada pixel necessita de 24 bits para conter a informação necessária a uma imagem a cores, sendo, no caso do formato RGB, 8 bits alocados ao canal de vermelhos (Red), 8 bits ao canal de verdes (Green) e os outros 8 ao canal de azuis (Blue). Como uma imagem normal (512x512 pixels) em formato de 24 bits (True Color) ocupa um razoável espaço em disco (cerca de 768 Kbytes) é conveniente guardá-la em formato comprimido como por exemplo *jpeg* (Joint Photographers Expert Group).

Após a aquisição, as imagens são processadas, geralmente, com o objectivo de chegar até uma imagem binária contendo apenas a informação que interessa ao investigador. O primeiro passo do processamento de imagens é normalmente eliminar o ruído aleatório adquirido durante a aquisição da imagem. Nesta etapa é comum utilizar um filtro em que cada pixel é substituído pelo valor de uma operação englobando os vizinhos do mesmo. Os filtros

mais comuns para este fim são os filtros de média, de mediana, adaptativo, o filtro *wiener* e os filtros de baixas frequências, entre outros (Russ, 2007). No caso de existir ruído periódico, isto é, que se propaga de um modo não aleatório em toda a imagem, este pode ser identificado com recurso às transformadas de Fourier (Jähne, 2005; Russ, 2007) e retirado de seguida. O processamento prossegue, usualmente, com um passo de realce do contraste, através de uma normalização, equalização por histograma ou alterando a intensidade de visualização através da aplicação de uma função logarítmica ou exponencial ao valor de cada pixel. Pode-se ainda evidenciar os contornos dos objectos por aplicação de um filtro como o “*Mexican hat*”, o filtro de Laplace, de Sobel, de Roberts, outros filtros de altas frequências ou operadores derivativos de 1ª ordem (Russ, 2007). Para a binarização da imagem é necessário estabelecer um limite de detecção de cor que distinga os objectos do fundo, processo conhecido como limiarização. Este limite pode ser definido manualmente ou obtido automaticamente pelo cálculo da média ou da mediana da imagem, bem como através de outros parâmetros como o método da determinação do limite de detecção de cor óptimo de Otsu (Otsu, 1979). As imagens podem então ser binarizadas, o que origina a obtenção dos objectos com valor 1 e do fundo com valor 0 (os objectos surgem em cor branca sobre um fundo preto). Por vezes é necessário melhorar a imagem binária de modo a resolver alguns problemas, nomeadamente: remoção de objectos que se encontrem parcialmente cortados pela fronteira da imagem, de modo a não falsear os resultados obtidos; remoção de sujidades, o que pode ser conseguido através de um filtro de tamanho ou forma que apenas selecciona os objectos que interessam ao investigador; separação de objectos contíguos através de operações booleanas (e, ou, etc), erosões, dilatações, esqueletonização ou *watershed*, entre outras (Russ, 2007). A partir deste ponto do processamento é que o termo análise de imagem, em sentido restrito, realmente se aplica. Desta forma, as imagens são analisadas e calculados os parâmetros de interesse como por exemplo o número de objectos, tamanho, volumes, entre muitos outros.

Neste sentido, existem hoje diversas ferramentas informáticas de processamento e análise de imagem que permitem ao utilizador realizar as operações descritas. De entre essas ferramentas podem-se destacar o *daime - digital image analysis in microbial ecology*, (Daims et al., 2006), o *ImagePro Plus 6.1 (Media Cybernetics, Inc.)*, o *ImageJ* (Abramoff et al., 2004) e o *CellC* (Selinummi et al., 2005). Após experimentar todas as aplicações referidas, neste trabalho optou-se por utilizar a aplicação *CellC*, pois para além de ser gratuita e versátil, permite ainda que se altere o seu código de forma simples, caso necessário.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Fermentações e determinação de peso seco, densidade óptica e concentração de PHB

#### 2.1.1. Fermentações

Neste trabalho utilizou-se uma estirpe de *Escherichia coli* modificada com a inclusão do gene de síntese de P(3HB) da *Cupriavidus necator* no cromossoma da estirpe de *E. coli* (Pais, Tese em Curso).

Retiraram-se amostras de 5 experiências diferentes, sendo as condições de cada uma delas apresentadas na Tabela 2.1 (Pais, Tese em Curso).

Tabela 2.1 - Condições das experiências de fermentação.

Experiência	Meio	Condições
Experiência 1	Meio R + Soro	Experiência em bioreactor (Figura 2.1). Pulsos com controlo de pH. $pO_2 > 30\%$ (agitação + ar enriquecido com $O_2$ ).
Experiência 2	Meio R + Soro	Experiência em bioreactor. Pulsos com controlo de pH. $pO_2 > 30\%$ (agitação + $O_2$ ). $pO_2 > 10\%$ quando DO = 60.
Experiência 3	Meio R + Soro	Experiência em bioreactor. Pulsos com controlo de pH. $pO_2 > 30\%$ (agitação + $O_2$ ). $pO_2 > 10\%$ quando DO = 60.
Experiência 4	Meio R + Soro	Experiência em Erlenmeyer a 37°C. Agitação - 200 rpm.
Experiência 5	Meio R + Soro	Experiência em bioreactor. Alimentação contínua (30 g/l/h). $pO_2 = 60\%$ (agitação + $O_2$ )

Todas as experiências decorreram em condições estéreis e em todas as experiências foram adicionados pulsos de solução de soro concentrada de forma a manter a concentração no reactor em 20g/l de soro, existindo também um controlo de pH através da adição de  $NH_4OH$ , excepto na experiência 4.

O meio R é um meio mineral preparado a partir de soro de leite em pó. A preparação começa com a dissolução de 300 g de soro em pó num litro de água destilada. De seguida é removido o excesso de proteínas da solução de soro, ajustando o pH para 4.5 através da adição de HCl 37% (w/v). Após este passo, a solução é autoclavada durante 15 minutos a 121°C, removendo-se de seguida os agregados de proteínas através de uma centrifugação a

11 000 g, durante 15 minutos numa garrafa esterilizada. Na fase final, o pH é ajustado para 6.5 com NaOH e os agregados mais pequenos são removidos com uma filtração num filtro de papel *Whatman* n.º 3, em condições estéreis (Pais, Tese em Curso).



Figura 2.1 - Montagem experimental utilizada nas experiências 1, 2, 3 e 5 (Pais, Tese em Curso).

### 2.1.2. Amostragem

Ao longo do tempo de fermentação, foram retiradas amostras do caldo de fermentação (15 ml) para posterior avaliação do crescimento celular, quantificação da produção de PHA e análise de imagem.

Uma porção da amostra retirada do fermentador (10 ml) foi utilizada para determinação de densidade óptica a  $600_{nm}$  e de pesos secos e para ser sujeita à análise de imagem, sendo a restante centrifugada (10 000 rpm, durante 10 minutos), para separação do sobrenadante das células (pellet).

O pellet obtido por centrifugação foi ressuspenso em NaCl 0.9% (w/v) e novamente centrifugado (10 000 rpm, durante 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado, sendo o pellet liofilizado (*Telstar, Cryodos*) durante 24 horas, sob vácuo e a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 0.071 mbar. O

pellet liofilizado foi utilizado para a posterior determinação do conteúdo em PHA (Pais, Tese em Curso).

### **2.1.3. Determinação de peso seco e densidade óptica a 600 nm**

Para seguir a evolução do crescimento microbiano utilizaram-se dois métodos, um indirecto e outro directo. O primeiro baseou-se na relação entre a massa celular e a dispersão da luz que atravessa a suspensão. Esta relação foi obtida através da medição da densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) das amostras brutas, medida no espectrofotómetro (*Elios  $\alpha$ , ThermoSpectronic*). O segundo método consistiu na determinação do peso seco (*CDW*) das amostras brutas por gravimetria: a amostra foi filtrada por vácuo num filtro de papel previamente seco e tarado. O filtro com a amostra foi seco a 100°C e novamente pesado. A diferença de massa correspondeu ao peso seco (American Public Health Association. et al., 1989). O crescimento foi avaliado em termos de concentração de biomassa activa, esta foi determinada subtraindo ao valor de concentração de peso seco o valor de concentração de polihidroxibutirato (Pais, Tese em Curso).

### **2.1.4. Determinação de concentração de PHB**

A determinação da concentração de polihidroxibutirato foi realizada através de cromatografia gasosa, de acordo com o método proposto por Braunegg (Braunegg et al., 1978) e Comeau (Comeau et al., 1988) com ligeiras modificações introduzidas por Satoh (Satoh, 1991). O método consiste na destruição das estruturas celulares, com hidrólise das cadeias de PHA e esterificação (metilação) dos monómeros obtidos.

O pellet obtido após centrifugação das amostras retiradas do reactor foi liofilizado e ressuspendido em 1 ml de uma solução de metanol ácido (20 %  $H_2SO_4$ ), contendo 0.50 mg/ml de heptadecano (padrão interno). Após adição de 1 ml de clorofórmio, a mistura foi digerida num termobloco, a 100°C, durante 3.5 horas. Após arrefecimento, foram adicionados 0.5 ml de água desionizada, sendo a mistura agitada num vórtex, para extrair os polímeros. Após separação das fases, a fase contendo clorofórmio foi recolhida para um recipiente contendo peneiros moleculares (0.3  $\mu m$ ), para retenção de alguma água ainda presente nesta fase. A fase de clorofórmio foi, então, analisada por cromatografia gasosa (GC) (*Chrompack*®)

equipada com um detector de ionização de chama a 220°C. Foi injectado 1 µl da fase de clorofórmio foi injectado numa coluna DBWAX 60m' 0.53mm '1µm.

O gás arrastador foi o hélio, a um caudal com uma pressão equivalente de 100 kPa. O programa de temperaturas do forno usado para as análises foi o seguinte: 40°C a 100°C (15 °C/min), 100° C durante 1 minuto, 100°C a 175°C (10 °C por minuto), 175°C durante 2 minutos, 175°C a 220 °C (10°C por minuto), 220°C durante 31 minutos.

Nove padrões de PHB/HV (70 %/30 %; Merck) de concentrações diferentes foram sujeitos ao mesmo procedimento utilizado para as amostras e injectados no GC (*Gas Chromatography*). Deste modo foi obtida uma curva de calibração, que permitiu obter uma correlação directa entre as concentrações de HB/HV e as áreas dos picos correspondentes (Pais, Tese em Curso).

## 2.2. Análise das condições de utilização dos corantes

### 2.2.1. Determinação da concentração óptima de DAPI

Nesta fase do trabalho efectuaram-se testes para determinar a concentração de DAPI mais adequada para se proceder à determinação da concentração celular por análise de imagem. Seguindo a descrição de (Boulos et al., 1999) preparou-se uma solução com concentração de 0.1 mg/ml de DAPI diluindo 1 mg de DAPI (*Sigma-Aldrich*) em 10 ml de água ultra-pura.

Seguindo as indicações presentes na literatura para contagem de células de amostras de fermentações com vinagre (Mesa et al., 2003) utilizou-se uma concentração final de DAPI de 10 µg/ml.

Para se testar a funcionalidade desta concentração de DAPI prepararam-se amostras provenientes da experiência 1, fixas com 5% de formaldeído, que foram observadas ao microscópio de epifluorescência (*Olympus BX51* - Figura 2.2), equipado com uma lâmpada de mercúrio, com uma ampliação de 1000x após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente (Boulos et al., 1999). A observação foi feita colocado 10 µl de amostra com corante numa lâmina, cobrindo-a de seguida com uma lamela e montando a preparação no microscópio com óleo de imersão (*Olympus Immersion Oil Type F*) utilizando o filtro adequado (*Olympus U-MNU2*), que foi sempre utilizado aquando da análise de amostras coradas com DAPI. De

seguida as imagens foram adquiridas e guardadas em formato digital (*jpg*) utilizando a aplicação *Olympus CellF* para posterior análise visual e determinação da eventual necessidade de alterar a concentração *DAPI*. As imagens foram guardadas recorrendo a compressão do tipo *jpeg*, com factores de qualidade entre 61.8 e 80, e com razões de compressão entre 40:1 e 140:1.



**Figura 2.2 - Microscópio Olympus BX51 e respectiva lâmpada, utilizado para a visualização de todas as amostras.**

### **2.2.2. Análise das condições de realização de *double-staining* com *DAPI* e Azul de Nilo**

Nesta parte do trabalho determinaram-se as condições de viabilização da realização de *double-staining* com *DAPI* e Azul de Nilo. A única referência a uma experiência semelhante na literatura foi feita por Oshiki (Oshiki et al., 2008), mas não se encontra detalhada o suficiente de forma a permitir que se siga o seu procedimento.

O Azul de Nilo utilizado neste trabalho consistiu numa solução de 1% p/v de Azul de Nilo em água destilada (Ostle and Holt, 1982), e utilizaram-se 0.2 ml solução/ml de amostra para corar as amostras.

O primeiro aspecto que se testou foi a viabilidade da incubação de *DAPI* a 56 °C durante 10 minutos, necessária para a utilização do Azul de Nilo (Ostle and Holt, 1982). Neste teste, adicionaram-se 20  $\mu$ l de *DAPI* a 0.2 ml de amostra e incubou-se essa amostra numa estufa a 56 °C durante 10 minutos. Seguidamente, recolheram-se 10  $\mu$ l de amostra que foram colocados numa lâmina e cobertos com uma lamela e óleo de imersão para posterior observação ao microscópio de fluorescência (*Olympus BX51*, ampliação 1000x), equipado com uma lâmpada de mercúrio através do filtro *Olympus U-MNU2*.

Num passo seguinte testou-se a viabilidade da utilização conjunta e simultânea de *DAPI* e Azul de Nilo. Assim, adicionaram-se 20  $\mu$ l de *DAPI* e 40  $\mu$ l de Azul de Nilo a 0.2 ml de amostra, incubando de seguida na estufa durante 10 minutos a 56 °C. De seguida, recolheram-se 10  $\mu$ l de amostra que foram colocados numa lâmina e cobertos com uma lamela e óleo de imersão para posterior observação ao microscópio de fluorescência (1000x). Foi ainda testada a hipótese de adicionar o *DAPI* após a incubação do Azul de Nilo. Para a observação de todas as amostras coradas com Azul de Nilo referidas neste trabalho utilizou-se o filtro *Olympus U-MWB2*.

Estes testes foram repetidos em membranas negras de policarbonato. O processo foi semelhante até ao passo de filtração. Desta forma após a incubação com 40  $\mu$ l de Azul de Nilo ou ambos os corantes, 10  $\mu$ l de amostra foram diluídos em 2 ml de *PBS*, adicionando-se de seguida os 20  $\mu$ l de *DAPI* caso não tivesse sido adicionado antes da incubação. De seguida a amostra foi recolhida com uma seringa e filtrada numa membrana negra de policarbonato montada num filtro metálico (Figura 2.3), de modo a não sujar o filtro do *kitasato* e o material adjacente, e de modo a permitir uma filtração no escuro para evitar que a fluorescência do Azul de Nilo se degradasse. Nesta parte do trabalho, a filtração foi feita despejando lentamente o conteúdo da seringa para não destruir as células. De seguida, a membrana foi retirada do suporte e colocada numa lâmina e coberta com uma lamela e óleo de imersão, procedendo-se de seguida á observação no microscópio de epifluorescência. Foi ainda testada a possibilidade de adicionar óleo de imersão entre a membrana e a lamela.

Todas as imagens foram adquiridas e guardadas em formato digital (*jpg*) utilizando a aplicação *Olympus CellF*. As imagens foram guardadas recorrendo a compressão do tipo *jpeg*, com factores de qualidade entre 61.8 e 80, e com razões de compressão entre 40:1 e 140:1.



**Figura 2.3 - Filtro metálico utilizado como suporte para a filtração em membranas de polycarbonato das amostras coradas com Azul de Nilo**

### **2.3. Fixação das Amostras**

Inicialmente foram preparados 500 ml de uma solução de tampão fosfato (*PBS*) de acordo com (Sambrook and Russell, 2006). Assim, a 400 ml de água destilada adicionaram-se 4 g de NaCl, 0.1 g de KCl, 0.72 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 0.13 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . De seguida o pH foi ajustado para 7.4 com a adição de HCl e NaOH e adicionada água destilada até se atingir o volume de 500 ml. No final desta preparação, a solução foi esterilizada por autoclavagem (20 minutos a 121 °C).

Durante as experiências 1, 2 e 3 foram testados quatro métodos diferentes de fixação/conservação das células para posterior análise, após recolha das amostras numa seringa esterilizada. Nas experiências 1 e 2 todo o material e soluções que contactaram com as amostras estavam estéreis e todos os passos foram realizados numa câmara de fluxo laminar.

O primeiro desses métodos consistiu na conservação das células em glicerol (Howard, 1956). O primeiro passo após a recolha de 0.8 ml de amostra foi a lavagem das células, através de uma centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos e posterior ressuspensão em *PBS*, em volume igual ao retirado de sobrenadante, auxiliada pelo vórtex caso fosse necessário. De seguida foram adicionados 0.2 ml de glicerol à amostra e esta foi congelada a -20 °C em *eppendorfs*.

O segundo método consistiu na lavagem de 0.5 ml de amostra que foi efectuada de modo semelhante ao descrito no método anterior, seguida da adição de 0.55 ml de etanol

absoluto a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e de 0.065 ml de formaldeído a 36.5 % (Celis, 2006). No final as amostras foram conservadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  em *eppendorfs*.

O terceiro método testado foi semelhante ao primeiro, mas sem se que fosse efectuada a lavagem e ressuspensão das células em *PBS*. Assim a 0.2 ml de amostra foram adicionados 0.6 ml de *PBS* e 0.2 ml de glicerol, sendo as células conservadas de seguida a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  em *eppendorfs*.

O quarto método envolveu a adição de 0.8 ml de *PBS* a 0.2 ml de amostra, seguidos da adição de 0.055 ml de formaldeído a 36.5%, ou seja, 5% de concentração final (Bjornsen, 1986; Blackburn et al., 1998; Bloem et al., 1995; Mesa et al., 2003). As células foram então conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  em *eppendorfs*.

Nas experiências 3, 4 e 5 testou-se o tratamento das células sem cuidados de esterilidade dos materiais e da atmosfera, com vista a uma optimização em termos de tempo do processo de recolha das amostras.

Nas experiências 4 e 5 só se utilizou o quarto método de fixação para conservar as células.

### **2.3.1. Análise da eficiência dos métodos de fixação.**

Após determinada a concentração ideal de *DAPI* a utilizar nos ensaios de determinação da concentração celular, passou-se à fase de recolha de imagens para análise da eficiência dos métodos de fixação estudados.

Inicialmente fizeram-se observações de amostras da experiência 1 e 2 fixas de acordo com os métodos já descritos na secção anterior. Numa primeira parte, as amostras foram observadas ao microscópio no modo de campo claro colocando 10  $\mu\text{l}$  de amostra numa lâmina, cobrindo-a com uma lamela e óleo de imersão e guardando imagens digitais das observações. Após a observação as amostras foram diluídas, se necessário, para que se observassem aproximadamente cerca de 30-50 células por campo (Boulos et al., 1999; Kepner and Pratt, 1994), contabilizadas visualmente, embora se aceitassem amostras com um número de células por campo entre 20 e 100 (Pascaud et al., 2009). Todas as imagens foram adquiridas e guardadas em formato digital (*jpg*) utilizando a aplicação *Olympus CellF*. As imagens foram guardadas recorrendo a compressão do tipo *jpeg*, com factores de qualidade entre 61.8 e 80, e com razões de compressão entre 40:1 e 140:1.

As imagens foram depois analisadas visualmente de forma a aferir a validade e eficiência dos métodos de fixação utilizados.

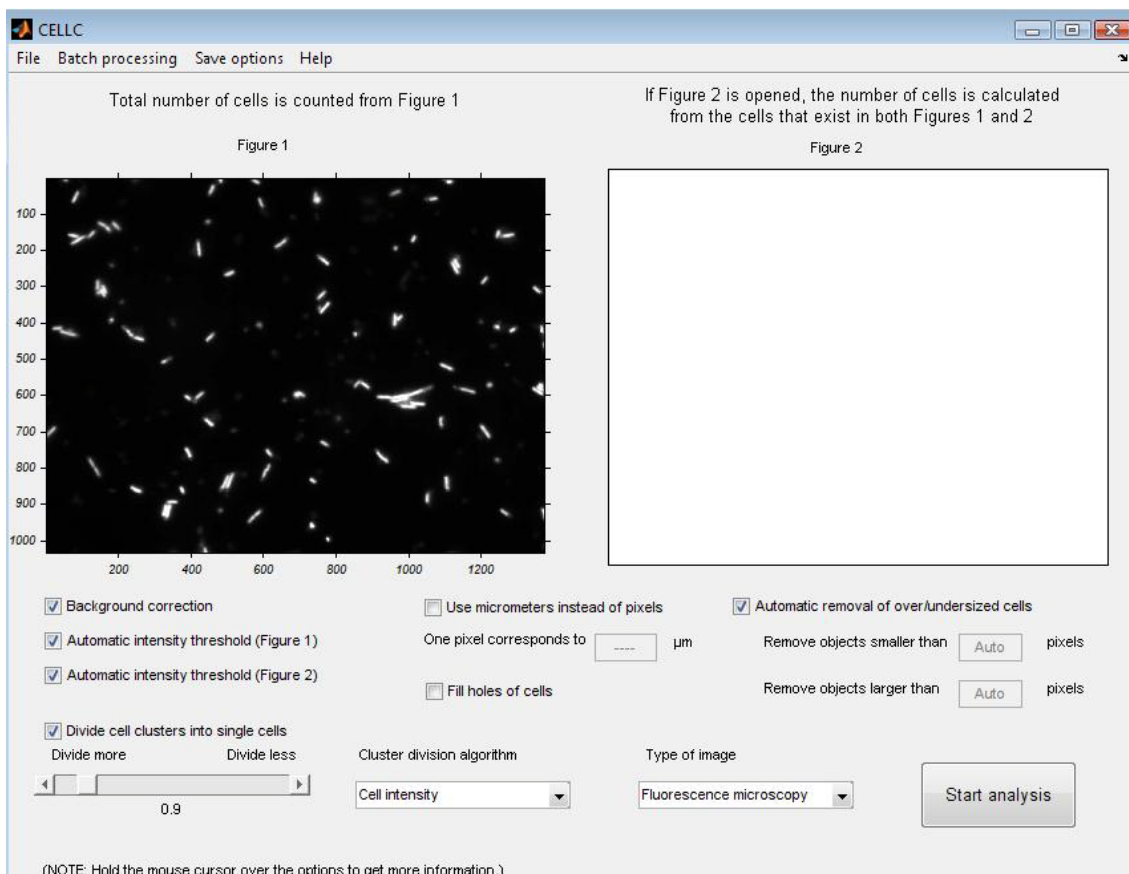
Este tipo de análise foi repetido utilizando membranas negras de polycarbonato (*MicronKlear Polycarbonate Disc Filters, MSI*) com 0.2  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro e 2.5 cm de diâmetro para filtrar as células das amostras, de forma a permitir uma comparação de resultados e eficiência com o método anterior, e também para identificar possíveis incompatibilidades com o corante.

Neste passo, 0.2 ml de amostra foram corados com 20  $\mu\text{l}$  de *DAPI*, num *ependorf*, e deixou-se incubar 5 minutos à temperatura ambiente. De seguida, diluíram-se 10  $\mu\text{l}$  de amostra em 4 ml de *PBS* (Kepner and Pratt, 1994), sendo ainda testado os valores de 2 ml e 1 ml. Montou-se uma membrana de polycarbonato sobre um filtro de papel (Hobbie et al., 1977), num *kitasato* ligado a uma bomba de vácuo. A amostra foi filtrada nesta montagem com o mínimo de vácuo necessário para que a filtração ocorresse, de forma a evitar que as células fossem danificadas. Seguidamente a membrana foi colocada numa lâmina, coberta com óleo de imersão e tapada com uma lamela (Kepner and Pratt, 1994) e novamente com óleo de imersão. Finalmente procedeu-se à observação no microscópio de epifluorescência (ampliação 1000x) e todas as imagens foram adquiridas e guardadas em formato digital (*jpg*) utilizando a aplicação *Olympus CellF*. As imagens foram guardadas recorrendo a compressão do tipo *jpeg*, com factores de qualidade entre 61.8 e 80, e com razões de compressão entre 40:1 e 140:1.

## 2.4. Desenvolvimento do método de análise de imagem.

### 2.4.1. A aplicação *CellC*

Neste trabalho utilizou-se o *software CellC* (Selinummi et al., 2005), que é uma aplicação desenvolvida em linguagem *MatLab* (*MatLab 6.5, MathWorks*). Este *software* permite analisar células numa imagem (contagem total), ou num par de imagens (contagem total e contagem específica). Possui ainda uma interface gráfica que torna o processo mais fácil e intuitivo para o utilizador e permite o ajuste manual de alguns parâmetros (Figura 2.4).



**Figura 2.4 - Aspecto da interface gráfica da aplicação CellC**

Esta aplicação permite o processamento *batch* de um conjunto de imagens sem que seja necessária a intervenção do utilizador. Os resultados são guardados num ficheiro *ASCII* (*American Standard Code for Information Interchange*) de valores separados por vírgulas (*CSV – comma-separated values*), que pode ser aberto em qualquer programa que lide com folhas de cálculo. A nível de resultados, para além da contagem das células, são ainda apresentados valores de área, comprimento, largura, volume e intensidade de fluorescência para cada célula presente na imagem. No final de um processamento *batch* é criado um ficheiro *CSV* com o sumário dos resultados e são guardadas as imagens binárias resultantes do processamento das imagens de partida.

Para além de permitir análises completamente automáticas, o processamento de imagem pode ser modificado pela alteração manual de alguns parâmetros de análise. De entre esses parâmetros podem-se destacar o controlo manual da limiarização de intensidade, caso a limiarização automática falhe devido a problemas na imagem; a correcção automática do fundo, que pode ser ligada ou desligada manualmente; o grau de separação de células em *clusters*, que permite uma separação dinâmica e versátil das imagens, conforme o grau de agregação; o tipo de imagem de partida, que pode ser proveniente de microscopia de

fluorescência ou de luz visível; a possibilidade de definir manualmente ou de forma automática os valores mínimos e máximos para o tamanho das células, permitindo a eliminação de ruídos da imagem; por fim, a possibilidade de escolher píxéis ou micrómetros como valor fundamental da escala.

Tratando-se de uma aplicação *Open Source*, existe a possibilidade de o utilizador final fazer modificações que permitam uma melhor adaptação à uma determinada aplicação em particular. No que diz respeito à segmentação da imagem o algoritmo utilizado no *CellC* tem o esquema representado na Figura 2.5.

O primeiro passo efectuado por este algoritmo é a normalização dos valores de intensidade da imagem. Assim, quer a imagem de origem seja uma imagem *RGB* com três canais ou uma imagem em escala de cinza, os valores mínimos de intensidade são subtraídos a todos os outros procedendo-se de seguida à divisão dos valores resultantes pelos máximos. Desta forma, a intensidade é normalizada para valores entre 0 e 1.

De seguida, caso a imagem de origem seja uma imagem *RGB*, existe uma conversão para uma imagem em escala de cinza, com 256 valores de intensidade e 8 *bits*. No entanto, essa conversão não é realizada utilizando directamente a função existente no *MatLab* para esse efeito (função *rgb2gray*). Em vez desse método, a imagem *RGB* é transformada para o espaço *HSV*, e é o canal *Value* (que pode ser entendido como intensidade ou quantidade de cor) que é adquirido e utilizado como a imagem em escala de cinza correspondente à imagem *RGB* inicial.

No passo seguinte ocorre um realce do contraste da imagem em escala de cinza. O método pré-definido na aplicação *CellC* e aquele que foi utilizado neste trabalho envolve uma transformação *top-hat* e uma transformação *bottom-hat*, usando como elemento estrutural um disco com 15 píxéis de raio (Selinummi et al., 2005). Para entender no que consiste este processo, é necessário definir alguns conceitos base relativos a métodos de transformação morfológica de imagens binárias. Os primeiros conceitos a ter em conta são a erosão e a dilatação de uma imagem, e também a definição de elemento estruturante. O elemento estruturante consiste numa matriz binária que pode ter as mais variadas formas e tamanhos no que diz respeito à distribuição dos valores de zero e um ao longo das suas linhas e colunas. Nesta matriz existe um centro geográfico, na forma de um pixel central, e esse pixel vai “percorrer” todos os píxéis da imagem a transformar. Na dilatação de uma imagem, sempre que o pixel central está numa coordenada em que outro pixel de valor um do elemento estruturante se sobrepõe a um pixel de valor um da imagem, a posição onde se encontra o elemento estruturante passa a ter o valor um. No processo de erosão, o que acontece é um

pouco o inverso. Assim, sempre que o pixel central está numa coordenada em que o elemento estruturante não está todo contido na imagem original, essa posição passa a ter o valor de zero (Gonzalez et al., 2004). A Figura 2.6 exemplifica o que acontece em cada uma destas operações.

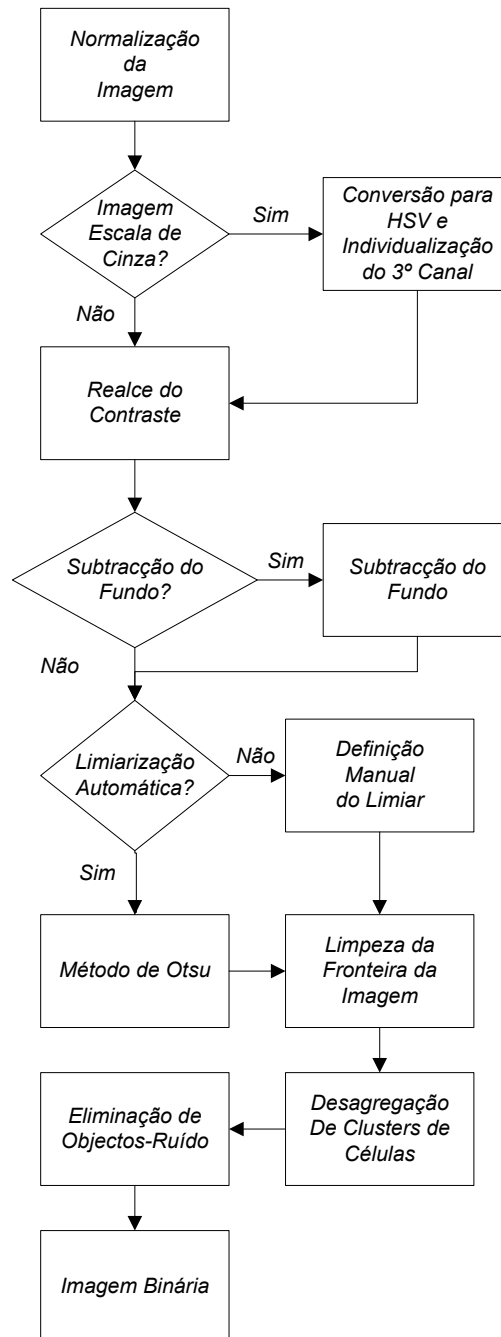
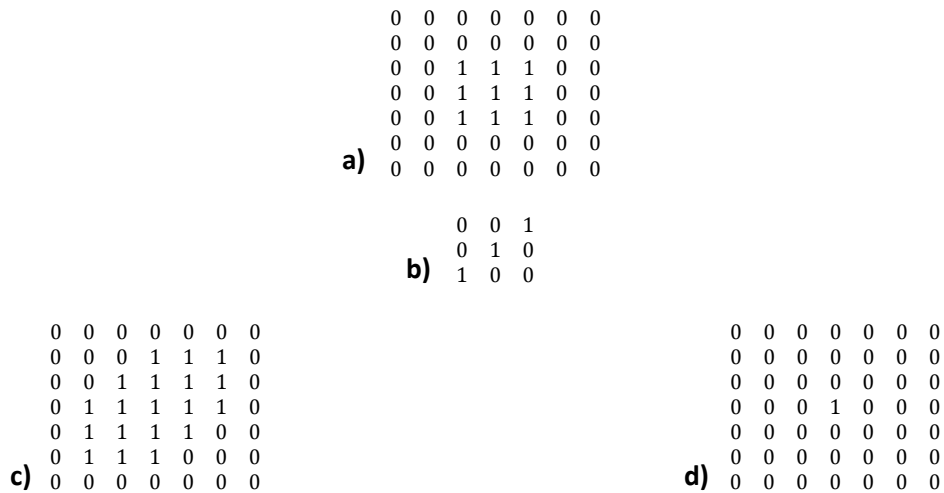


Figura 2.5 - Representação do algoritmo de segmentação de imagem utilizado na aplicação CellC



**Figura 2.6 – Exemplificação dos processos de dilatação e erosão. A imagem binária (a) é sujeita a dilatação com o elemento estruturante b), originando a imagem binária c). A erosão de a) com o elemento estruturante b) origina d) (adaptado de Gonzalez (Gonzalez et al., 2004)).**

Quando se aplica estas transformações em imagens em escala de cinza, existem algumas diferenças, pois estas imagens possuem 256 valores de intensidade e não apenas dois como as imagens binárias. Nestes casos, usualmente, usam-se elementos estruturais binários para proceder à transformação. A principal diferença em relação a imagens binárias é que na operação de dilatação em vez de os pixéis afectados passarem a ter o valor de um, passam a ter o valor do máximo de intensidade da região ocupada pelo elemento estruturante quando o seu pixel central está numa determinada coordenada. Da mesma forma, na operação de erosão, os pixéis afectados em vez de passarem a ter valor zero, passam a ter o valor mínimo de intensidade da região ocupada pelo elemento estruturante. Combinando estas duas operações simples, podemos efectuar aquilo que se designa por abertura e fecho de uma imagem (Figura 2.7). Assim, a realização de uma erosão seguida de uma dilatação consiste na operação de abertura de uma imagem, enquanto que o contrário, ou seja uma dilatação seguida de uma erosão consiste no fecho de uma imagem. Quando se subtrai uma imagem sujeita a abertura à imagem de partida está-se a efectuar uma transformação *top-hat*, enquanto que subtrair a imagem original a si mesma após uma operação de fecho consiste numa transformação *bottom-hat* (Gonzalez et al., 2004). Após efectuadas as transformações, o resultado da transformação *top-hat* é somado à imagem original e ao resultado desta soma é subtraído o resultado da transformação *bottom-hat*. Ao aumentar significativamente o gradiente de intensidade nas fronteiras dos objectos, esta operação permite realçar o contraste da imagem, como se pode ver na Figura 2.8. Nesta fase é ainda efectuada uma normalização dos valores da intensidade da imagem, semelhante à normalização inicial.

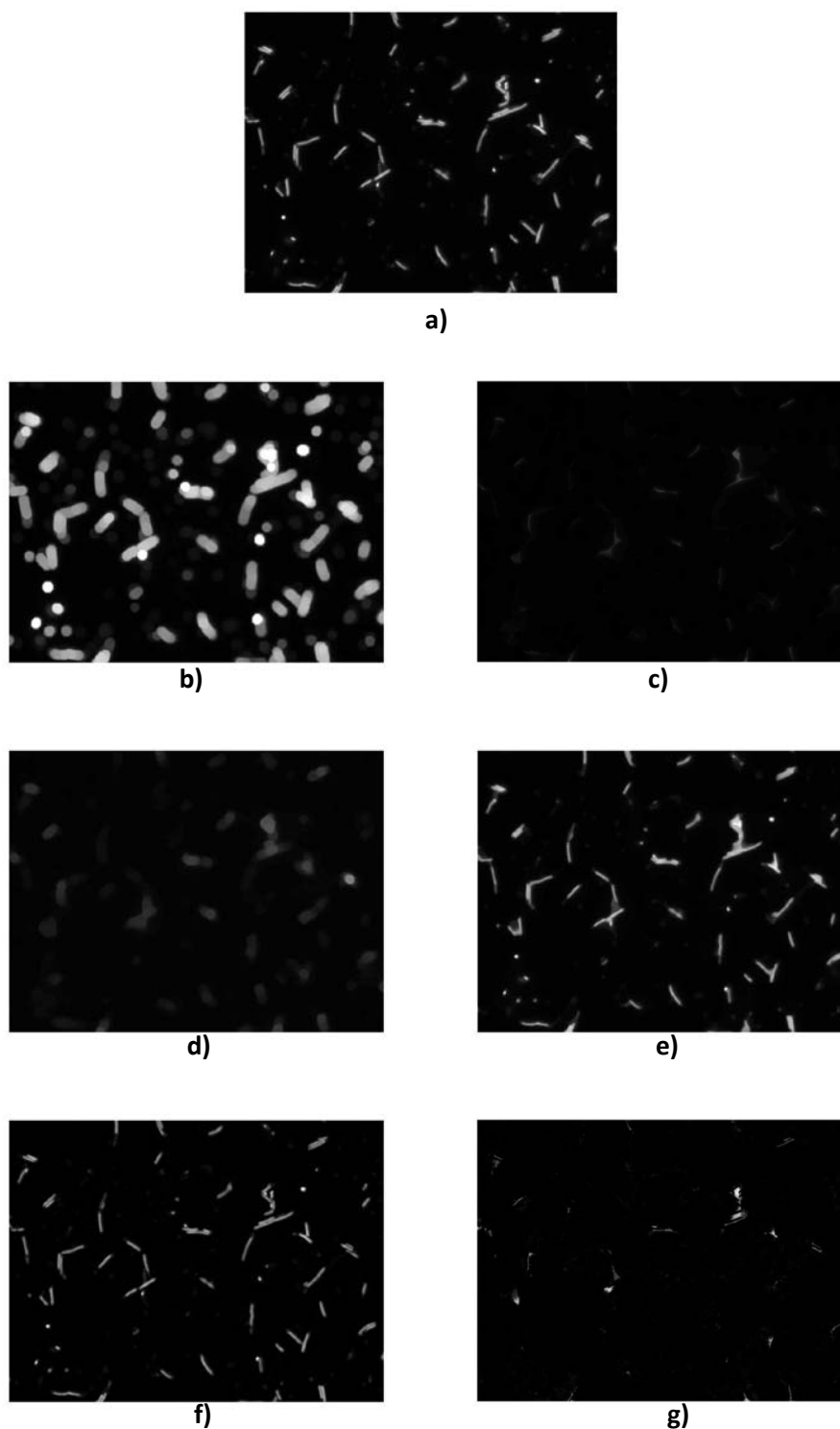
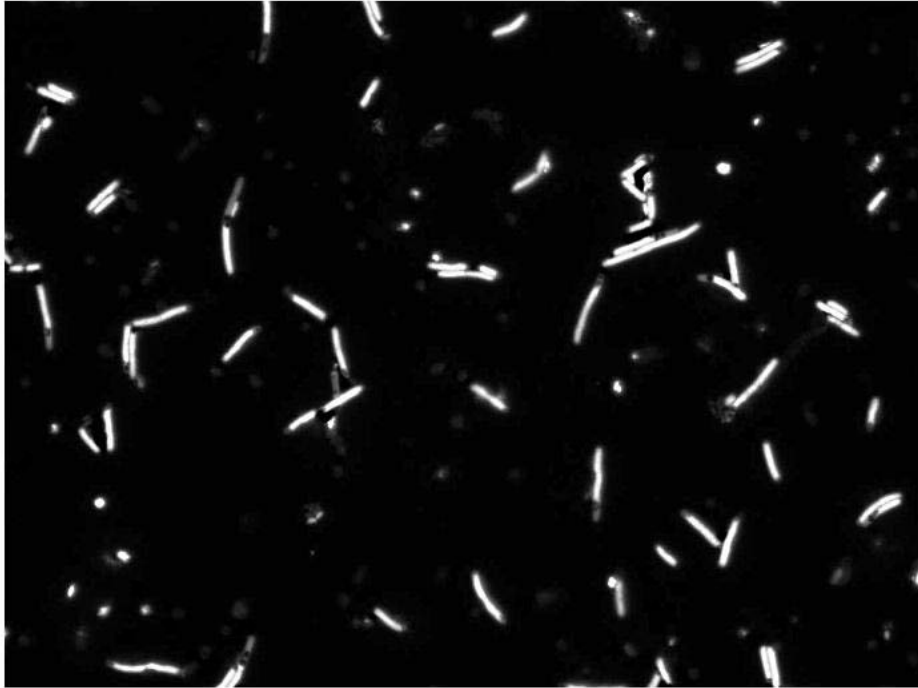


Figura 2.7 – Neste exemplo, a imagem original (a) é sujeita a uma operação de dilatação (b) e também é sujeita a uma erosão (c), utilizando como elemento estruturante um disco com 15 pixéis de raio. A imagem (d) é o resultado de aplicar uma dilatação á imagem (c), ou seja é a abertura da imagem (a). O fecho da imagem (a) é efectuado aplicando uma erosão à imagem (b), e resulta na imagem (e). A imagem (f) corresponde a uma transformação *top-hat*, e é resultado da subtracção de (d) a (a). A imagem (g) exemplifica a transformação *bottom-hat* e resulta da subtracção de (a) a (e).

a)



b)

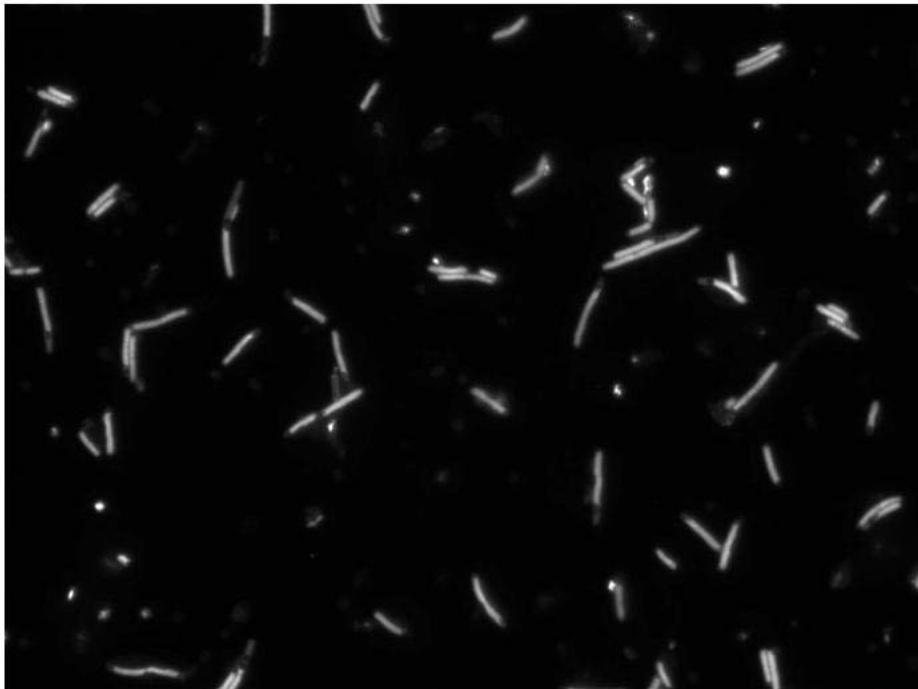
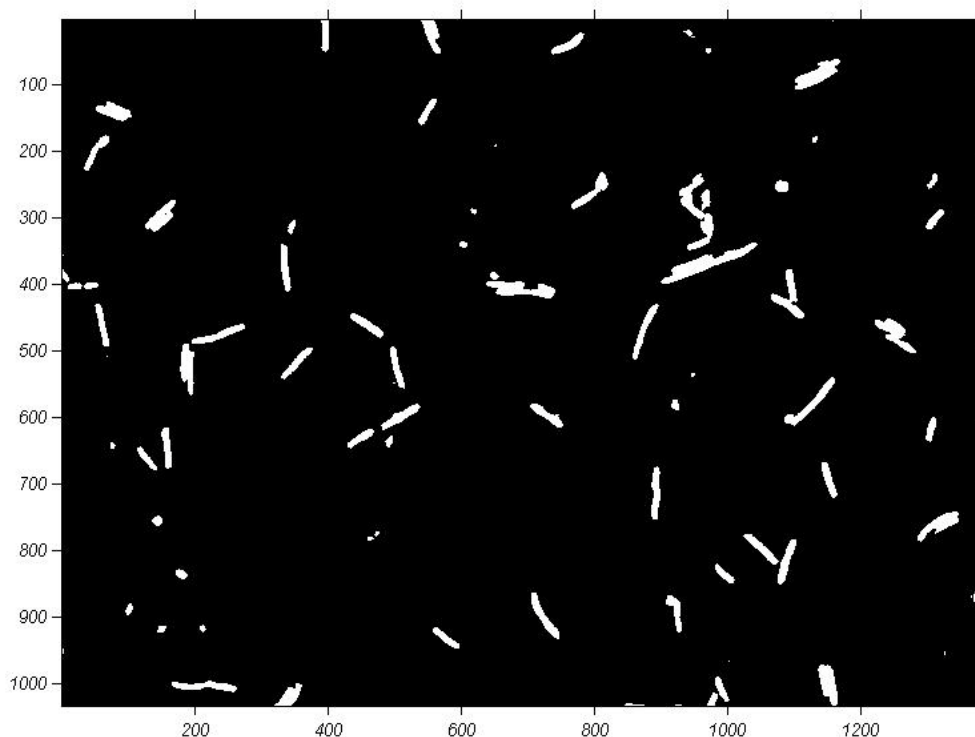


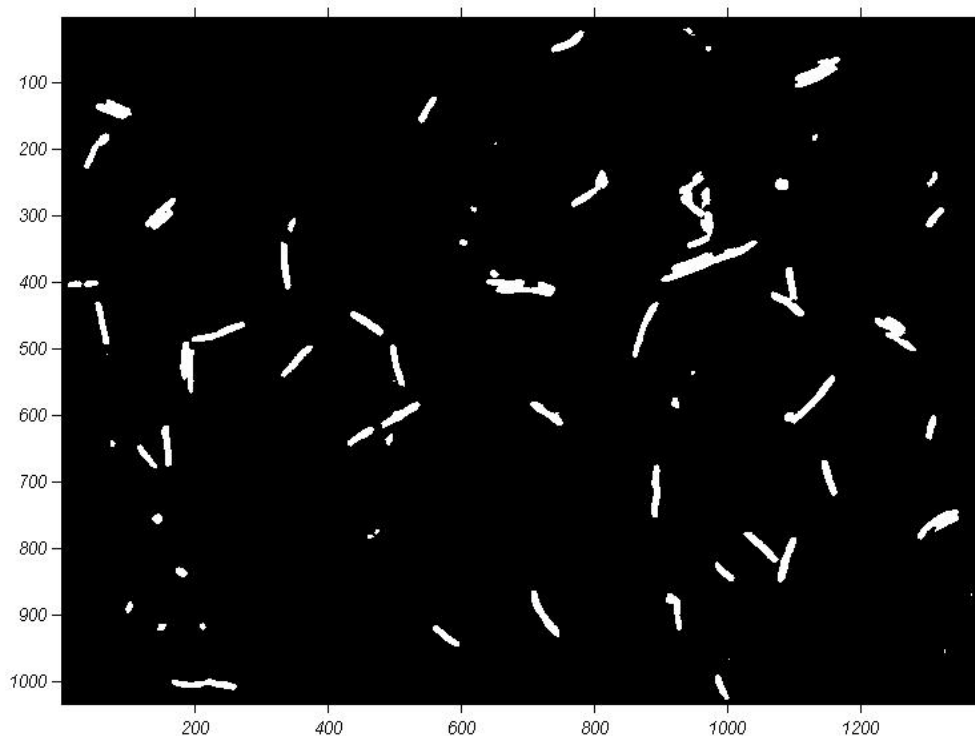
Figura 2.8 – A imagem (a) é o resultado do realce de contraste através da subtração de uma transformação *bottom-hat* (Figura 2.6 (g)) à soma de uma transformação *top-hat* (Figura 2.6 (f)) com a imagem original (b). É notória a diferença entre o contraste nas duas imagens.

Após este realce do contraste é efectuada a subtracção do fundo, se esta opção estiver activada, subtraindo á imagem os valores de uma regressão bidimensional de grau dois feita pelo *software* a toda a imagem. De seguida, vem o passo de limiarização da imagem, que é aquele em que são identificados os objectos presentes na imagem, sendo o resultado uma imagem binária com os objectos (células neste caso) a branco e o fundo a preto. A limiarização pode ser feita manualmente, através de uma interface que permite através da deslocação de um *slider* determinar o valor do limiar de separação entre objecto e fundo, visualizando em tempo real a imagem binária resultante. Se a opção for a limiarização automática (Figura 2.9), o *software* aplica o método de Otsu a toda a imagem (Otsu, 1979; Selinummi et al., 2005).



**Figura 2.9-** Resultado da limiarização automática, pelo método de *Otsu*, na aplicação *CellC*.

Por fim, existe um passo em que são removidas todas as células que estejam nas fronteiras da imagem, para que a caracterização não seja afectada por objectos com dimensões falsas (Sieracki et al., 1985), e cujo resultado se pode ver na Figura 2.10. Este passo não está presente na versão original da aplicação, mas foi incluído por se considerar que era importante.

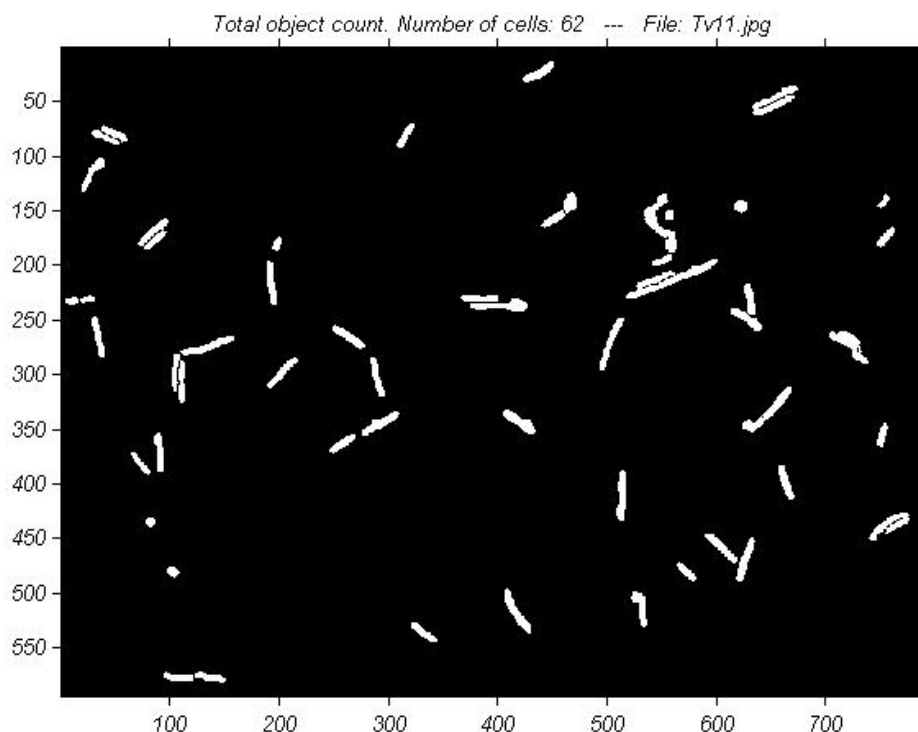


**Figura 2.10 - Eliminação de todos os objectos fronteiros da imagem após limiarização (Figura 2.9).**

Neste ponto obtém-se então uma imagem binária resultante da segmentação da imagem original. Antes de serem exportados os resultados, a imagem ainda vai sofrer duas possíveis alterações. A primeira dessas alterações é a desagregação de *clusters* de células, que pode ser mais ou menos profunda conforme o utilizador indicar na interface da aplicação. É necessário ter algum cuidado com esta função, pois a utilização de um valor demasiado elevado pode levar a sobredivisão dos agregados, resultando em mais células que na realidade, enquanto que a utilização de valores inferiores ao ideal resulta em subdivisão e em subestimação da concentração celular. A outra alteração que se pode efectuar nesta fase é remover ruído da imagem.

No que diz respeito aos passos a dar dentro da aplicação *CellC* com vista a obter os resultados da contagem, o processo é bastante simples. Inicialmente, é útil escolher uma escala baseada em micrómetros, devido a ser mais fácil ter uma ideia do tipo de resultados obtidos, em oposição a trabalhar com base em píxéis. Deve-se também ter o cuidado de seleccionar o tipo de imagem correcto, neste caso, imagem de microscopia de fluorescência. Para dar seguimento aos cálculos deve-se seleccionar ao menu "*Batch Processing*", e escolher a primeira opção do "*drop-down menu*" correspondente. De seguida é pedido ao utilizador que indique a pasta onde estão as imagens a analisar e a pasta onde devem ser guardados os resultados. No fim basta carregar no botão "*Start analysis*". Após realizada a análise é

necessário fazer uma inspeção das imagens para verificar se não existe sobredivisão ou subdivisão de agregados, e também, para verificar se o ruído foi eficazmente eliminado. Caso seja necessário deve alterar-se o valor do *slider* correspondente ao grau de separação de agregados e/ou os valores mínimos e máximos para remoção de ruído e repetir a análise. Após se ter a certeza que a segmentação da imagem foi bem sucedida é possível visualizar os resultados abrindo o ficheiro “*summary.csv*” criado na pasta de resultados, calculando-se nessa altura o erro padrão da contagem dividindo o desvio padrão pelo número de observações. Nesta altura, é também guardada uma imagem para cada imagem de partida com o aspecto da representada na, e que apresenta o resultado da contagem, cujo aspecto se pode ver na Figura 2.11.



**Figura 2.11 - Resultado final de uma análise de imagem para contagem de células na aplicação *CellC*.**

#### **2.4.2. Determinação da concentração celular através de análise de imagem**

Após a optimização do protocolo ao nível da fixação das amostras, da concentração de corantes e das estratégias de observação procedeu-se à sua aplicação tendo em vista a aquisição de imagens para efectuar contabilização de células por análise de imagem.

Assim, foram utilizadas as amostras fixas com 5% de formaldeído (concentração final), para as experiências 2, 3, 4 e 5. As amostras foram diluídas de acordo com as observações feitas previamente, aquando da realização dos testes prévios. De seguida, diluíram-se 10  $\mu$ l de amostra em 1 ml de *PBS* e adicionaram-se 20  $\mu$ l de *DAPI* a 0.1% (p/v). Após 5 minutos de incubação, a amostra foi recolhida numa seringa e filtrada numa membrana de negra de policarbonato, montada sobre um filtro de papel (Hobbie et al., 1977) num *kitasato* ligado a uma bomba de vácuo. A amostra foi filtrada nesta montagem com o mínimo de vácuo necessário para que a filtração ocorresse, de forma a evitar que as células fossem danificadas. Seguidamente a membrana foi colocada numa lâmina, coberta com óleo de imersão e tapada com uma lamela (Kepner and Pratt, 1994) e novamente com óleo de imersão. Finalmente procedeu-se à observação no microscópio de epifluorescência (ampliação 1000x) e à gravação das imagens obtidas no formato *jpg*. Todas as imagens foram adquiridas e guardadas em formato digital (*jpg*) utilizando a aplicação *Olympus CellF*. As imagens foram guardadas recorrendo a compressão do tipo *jpeg*, com factores de qualidade entre 61.8 e 80, e com razões de compressão entre 40:1 e 140:1. No que diz respeito ao número de imagens guardadas, observaram-se e guardaram-se 20 campos microscópicos por amostra (Mesa et al., 2003).

#### **2.4.3. Determinação da curva de calibração do número óptimo de diluições em função da densidade óptica e do peso seco.**

Após realizada a análise de imagem das amostras das experiências 2 e 3, foram determinadas as diluições óptimas para cada amostra analisada, tendo por base que a diluição óptima corresponderia a uma contagem de 40 células por campo. Após relacionar os valores obtidos com os valores medidos de  $DO_{600nm}$  e de  $CDW$ , estabeleceu-se uma curva de calibração com o objectivo de facilitar as análises das amostras das outras experiências.

#### 2.4.4. Determinação da concentração de PHB através de análise de Imagem.

Para determinar o conteúdo em PHB das células utilizou-se uma técnica de *double-staining* com *DAPI* e Azul de Nilo. Nesta parte do trabalho utilizaram-se também as amostras fixas com 5% final de formaldeído, que foram diluídas de acordo com a calibração feita na fase de determinação da concentração celular. De seguida adicionaram-se 40  $\mu\text{l}$  de Azul de Nilo a 0.2 ml de amostra e incubou-se na estufa durante 10 minutos à temperatura de 56 °C. Após esse tempo, diluíram-se 10  $\mu\text{l}$  de amostra em 1 ml de *PBS* e adicionaram-se 20  $\mu\text{l}$  de *DAPI*. Seguidamente a amostra foi recolhida com uma seringa e filtrada numa membrana negra de policarbonato montada sobre um filtro metálico. A filtração foi efectuada despejando cuidadosamente o conteúdo da seringa de modo a não danificar as células. No final da filtração colocou-se a membrana sobre uma lâmina e cobriu-se com uma lamela, observando-se de seguida ao microscópio de epifluorescência utilizando-se os filtros *Olympus U-MNU2* e *Olympus U-MWB2* para observar, respectivamente as células coradas com *DAPI* e o polímero corado com Azul de Nilo. Durante a observação guardaram-se 10 pares de imagens de células/polímero de cada amostra, de modo a observar um número significativo de células (Graça et al., 2005; Kirchman et al., 1982; Lunau et al., 2005), pertencendo cada par ao mesmo campo microscópico, para proceder depois à análise das mesmas. Todas as imagens foram adquiridas e guardadas em formato digital (*jpg*) utilizando a aplicação *Olympus CellF*. As imagens foram guardadas recorrendo a compressão do tipo *jpeg*, com factores de qualidade entre 61.8 e 80, e com razões de compressão entre 40:1 e 140:1.

Nesta parte do trabalho foi necessário recorrer ao programa *Matlab* para somar os pares de imagens obtidos durante a observação ao microscópio. Este passo foi necessário devido ao facto de o *DAPI* não penetrar nos espaços celulares ocupados pelo biopolímero, impossibilitando assim a obtenção directa de uma imagem que correspondesse ao conteúdo celular total. Após terem sido obtidas as imagens da soma das imagens originais, o processamento foi feito na aplicação *CellC* exactamente da mesma forma que para as imagens utilizadas para a determinação da concentração celular, primeiro para as imagens com conteúdo total das células e depois para as imagens referentes ao biopolímero. Não se utilizou a função "*Total Count/Specific Count*" da aplicação *CellC* porque revelou-se mais simples efectuar os cálculos a partir de dois ficheiros de resumo de resultados de dois *batches* diferentes do que apenas com um que englobasse apenas um *batch* dos pares de fotografias. A análise conjunta de todas as imagens também levanta problemas ao nível do ajuste dos parâmetros da aplicação, nomeadamente os parâmetros que dizem respeito à divisão de aglomerados de células e à remoção de ruído.

Depois de obtidos os resultados, foram calculados os volumes de polímero para cada par de fotografias de uma amostra. De seguida calculou-se uma média ponderada do volume de polímero tendo em conta o número de células de cada campo e o erro padrão dessa medida na forma do desvio padrão a dividir pelo número de observações.

#### 2.4.5. Caracterização das células através de análise de imagem.

A caracterização das células captadas nas imagens é feita a partir da imagem binária que resulta do processo de segmentação da soma das imagens, pois só assim é possível obter uma caracterização que tem em conta toda a célula. Nesta parte do processamento são determinados directamente da imagem os valores de perímetro, área e intensidade média luminosa das células. Já para as grandezas comprimento e largura, o cálculo que é efectuado vai depender da relação entre o perímetro e a área da célula (Bloem et al., 1995; Selinummi et al., 2005). Assim, é feito o cálculo do valor de:

$$\sqrt{\text{perímetro}^2 - 16 \times \text{área}} \quad \text{(Equação 2.1)}$$

Se este valor for negativo, caso das esferas, o comprimento e a largura são calculados como o diâmetro equivalente de um círculo com a área da célula em questão. Caso contrário, são calculados segundo as seguintes expressões:

$$\text{comprimento} = \left[ \text{perímetro} + \sqrt{\text{perímetro}^2 - 16 \cdot \text{área}} \right] / 4 \quad \text{(Equação 2.2)}$$

$$\text{largura} = \left[ \text{perímetro} - \sqrt{\text{perímetro}^2 - 16 \cdot \text{área}} \right] / 4 \quad \text{(Equação 2.3)}$$

No caso do volume, este é calculado a partir dos valores de comprimento e largura, através da seguinte expressão:

$$\text{Volume} = \frac{\pi}{4} \times \text{largura}^2 \times \left( \frac{\text{comprimento} - \text{largura}}{3} \right) \quad \text{(Equação 2.4)}$$

O biovolume total é calculado multiplicando o volume celular médio das células pelo número de células determinado por análise de imagem.

Cada imagem vai ter um ficheiro CSV associado com um relatório com todos os valores destas grandezas para cada célula detectada. Se for feito uma análise *batch* a um conjunto de imagens, é também criado um ficheiro resumo do desse *batch* com os valores médios das grandezas para cada imagem, assim como o número de células em cada imagem.



### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Análise das condições de utilização dos corantes

##### 3.1.1. Determinação da concentração óptima de *DAPI*

As imagens apresentadas de seguida fazem parte do conjunto que foi analisado para determinar se a concentração de 10  $\mu\text{g/ml}$  de *DAPI* era adequada, de acordo com o protocolo descrito na secção 2.2.1.

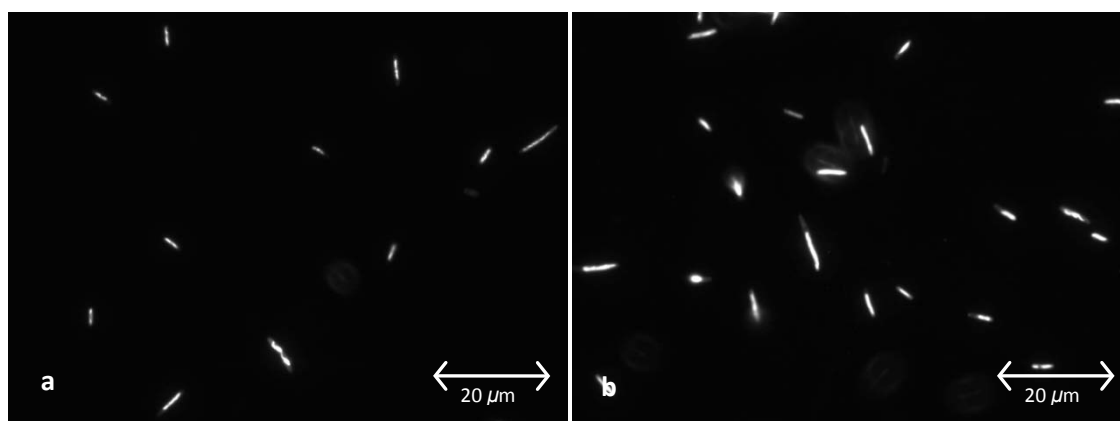
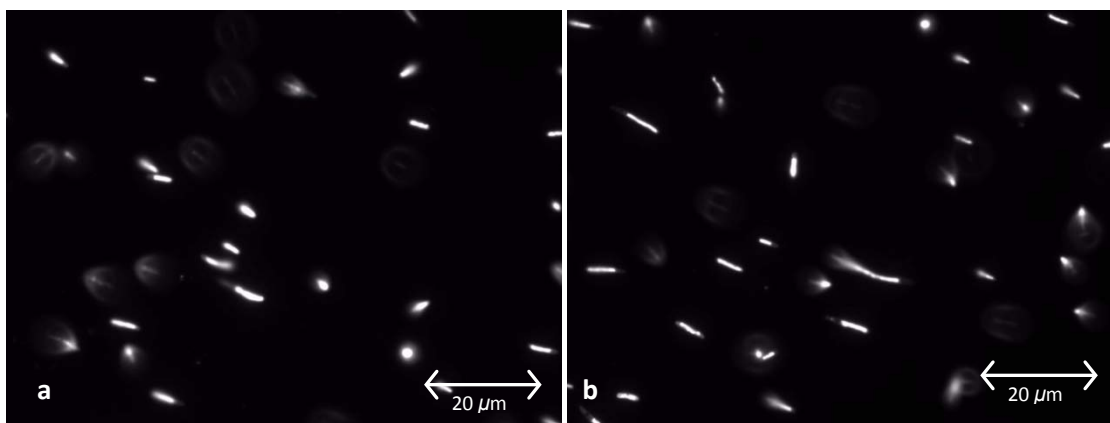


Figura 3.1 – Resultados do teste da concentração de *DAPI* em amostras fixas com 5% de formaldeído, em que (a) e (b) representam campos diferentes.

Como se pode observar na Figura 3.1, a concentração de *DAPI* testada demonstrou ter uma boa penetração nas células e uma boa evidenciação das células em relação ao fundo da imagem. Desta forma, usou-se uma concentração final de *DAPI* de 10  $\mu\text{g/ml}$  em todas as restantes observações com *DAPI*.

##### 3.1.2. Análise das condições de realização de *double-staining* com *DAPI* e Azul De Nilo

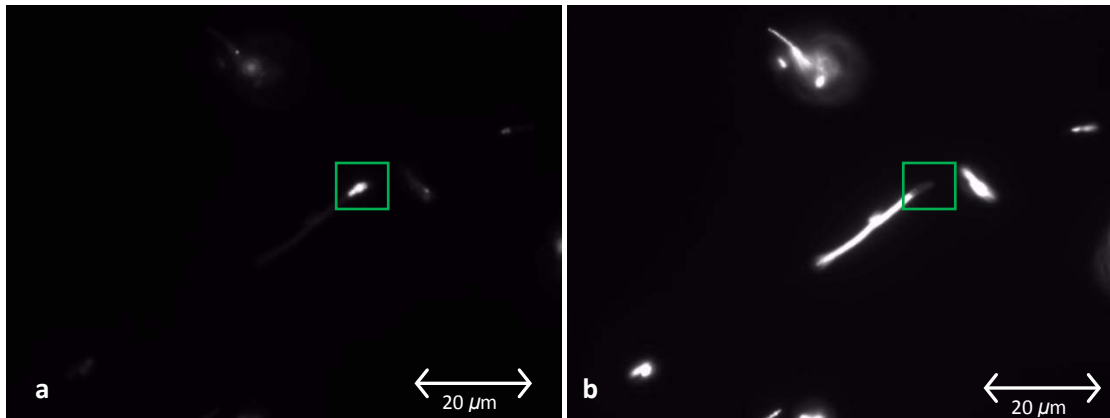
Nesta fase do trabalho testaram-se diversas hipóteses tendo como objectivo a realização de *double-staining* com *DAPI* e Azul de Nilo. O primeiro teste consistiu em analisar a possibilidade de incubar a amostra com *DAPI* durante 10 minutos a 56°C, e observar sem filtração em membranas de policarbonato. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 3.2.



**Figura 3.2 – Resultados do teste de incubação das amostras com *DAPI* a 56°C, em que (a) e (b) representam campos diferentes.**

Como se pode ver na Figura 3.2, o *DAPI* manteve toda a funcionalidade, quer ao nível da penetração nas células quer ao nível da fluorescência. Concluiu-se assim que se poderia utilizar o *DAPI* após 10 minutos a 56°C, caso fosse necessário.

Na Figura 3.3, mostram-se os resultados dos testes em que as amostras foram incubadas com *DAPI* e Azul de Nilo simultaneamente. A observação foi também efectuada sem se recorrer a filtração em membranas de polycarbonato.

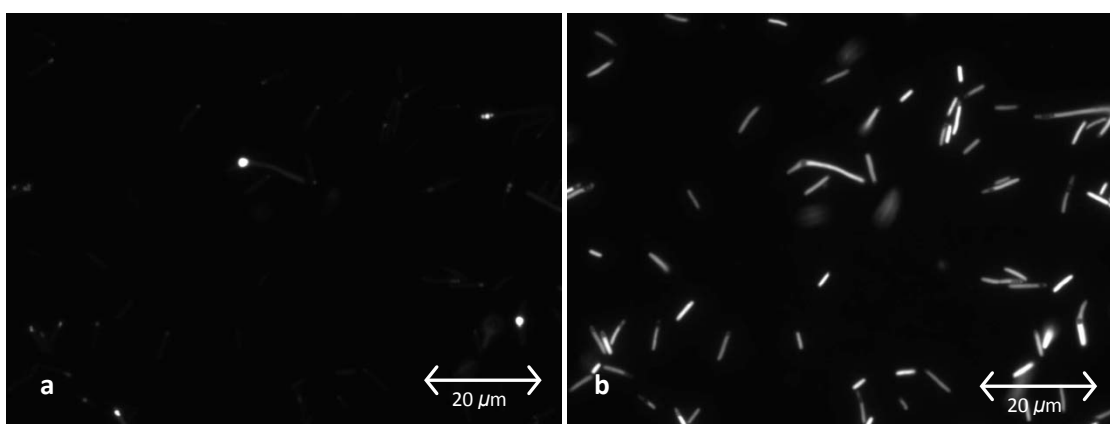


**Figura 3.3 - Resultados obtidos após incubação simultânea com *DAPI* e Azul de Nilo; (a) biopolímero com Azul de Nilo, (b) restante conteúdo da célula com *DAPI*.**

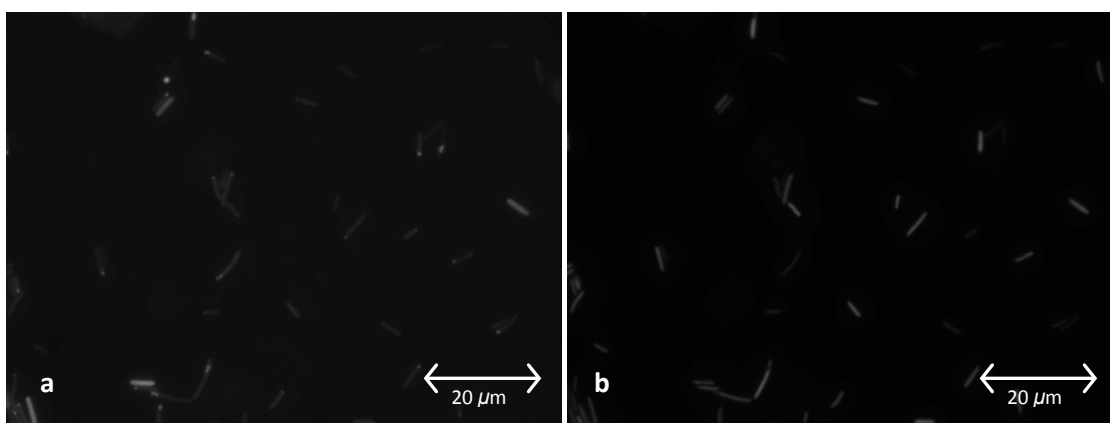
Mais uma vez verificou-se que o *DAPI* manteve toda a sua funcionalidade, mesmo incubado em conjunto com o Azul de Nilo durante 10 minutos a 56 °C. O único aspecto menos positivo, mas que não é possível de discernir através da observação da Figura 3.3 foi o facto de se verificar uma redução na duração da fluorescência de *DAPI* e do Azul de Nilo, no entanto essa redução não pareceu ser impeditiva de utilizar este método, pois foi possível obter as imagens necessárias com uma boa qualidade.

Este teste foi repetido recorrendo à filtração em membranas de policarbonato. Nesta fase testou-se a possibilidade de adicionar o *DAPI* após a incubação com Azul de Nilo. Os resultados apresentam-se a seguir (Figura 3.4 e Figura 3.5).

Recorrendo já à filtração em membranas negras de policarbonato, a incubação sucessiva (Figura 3.4) demonstrou ser mais eficaz que a incubação simultânea (Figura 3.5), pois a aplicação da incubação simultânea resultou numa diminuição evidente da fluorescência de ambos os corantes, já evidenciada anteriormente, mas mais pronunciada, talvez devido ao tempo que é necessário despendido no processo de filtração. Desta forma, optou-se por utilizar o método de incubação sucessiva nas análises seguintes.



**Figura 3.4 - Resultados das observações de amostras coradas simultaneamente com Azul de Nilo (a) e *DAPI* (b), após incubação sucessiva.**



**Figura 3.5 - Resultados das observações de amostras coradas simultaneamente com Azul de Nilo (a) e *DAPI* (b), após incubação simultânea.**

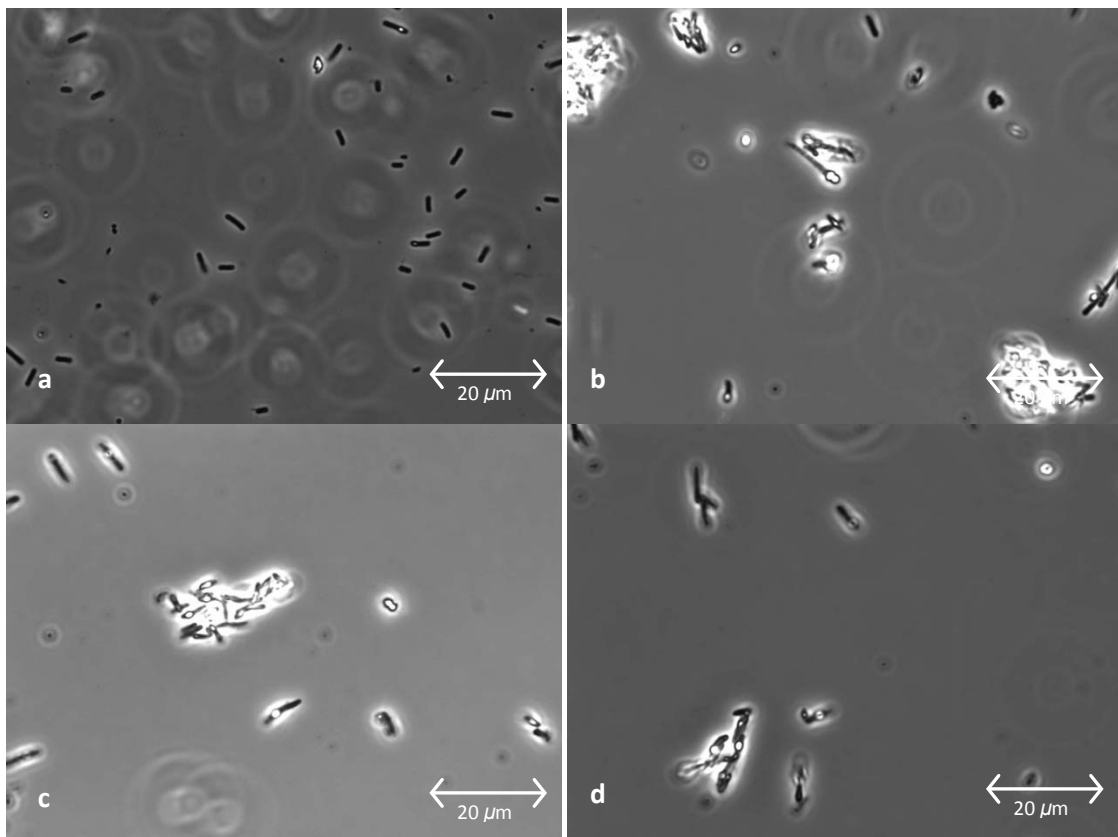
O método utilizado na filtração das amostras com Azul de Nilo, com um filtro metálico (Secção 2.2.2), demonstrou ser ineficaz na garantia de condições de homogeneidade, devido ao facto de ser impossível uma dispersão eficaz da pressão de filtração e também devido à impossibilidade de garantir a inexistência de líquido na membrana após a filtração. No entanto

nesta parte do trabalho a homogeneidade não é um requisito fundamental, uma vez que para contabilizar o conteúdo em biopolímero e caracterizar as células é apenas necessário observar um número significativo de células (Graça et al., 2005; Kirchman et al., 1982; Lunau et al., 2005). Neste método a pressão de filtração demonstrou ser um aspecto sensível na qualidade das imagens obtidas, pois uma descarga demasiado vigorosa do conteúdo da seringa mostrou-se danosa para a integridade das células, pelo que se concluiu ser necessário descarregar a amostra da seringa bastante devagar e com uma velocidade o mais homogénea possível, ou seja, com bastante cuidado e atenção.

Após estes resultados, concluiu-se que era realmente necessário usar processos de filtração diferentes para cada parte do trabalho. Na quantificação da concentração celular é imprescindível garantir a homogeneidade das amostras, o que apenas é possível utilizando o filtro de vácuo. Como a solução de *DAPI* é incolor, isto não apresenta nenhuma contrariedade no que diz respeito à conservação do material. Na quantificação do conteúdo em polímero a utilização do azul de Nilo implica que se utilize material fácil de limpar, como é caso do filtro metálico, e que permita que o processo de filtração ocorra na ausência de luz, para não degradar a fluorescência deste corante, que demonstra uma grande sensibilidade neste aspecto.

### 3.2. Análise da eficiência dos métodos de fixação

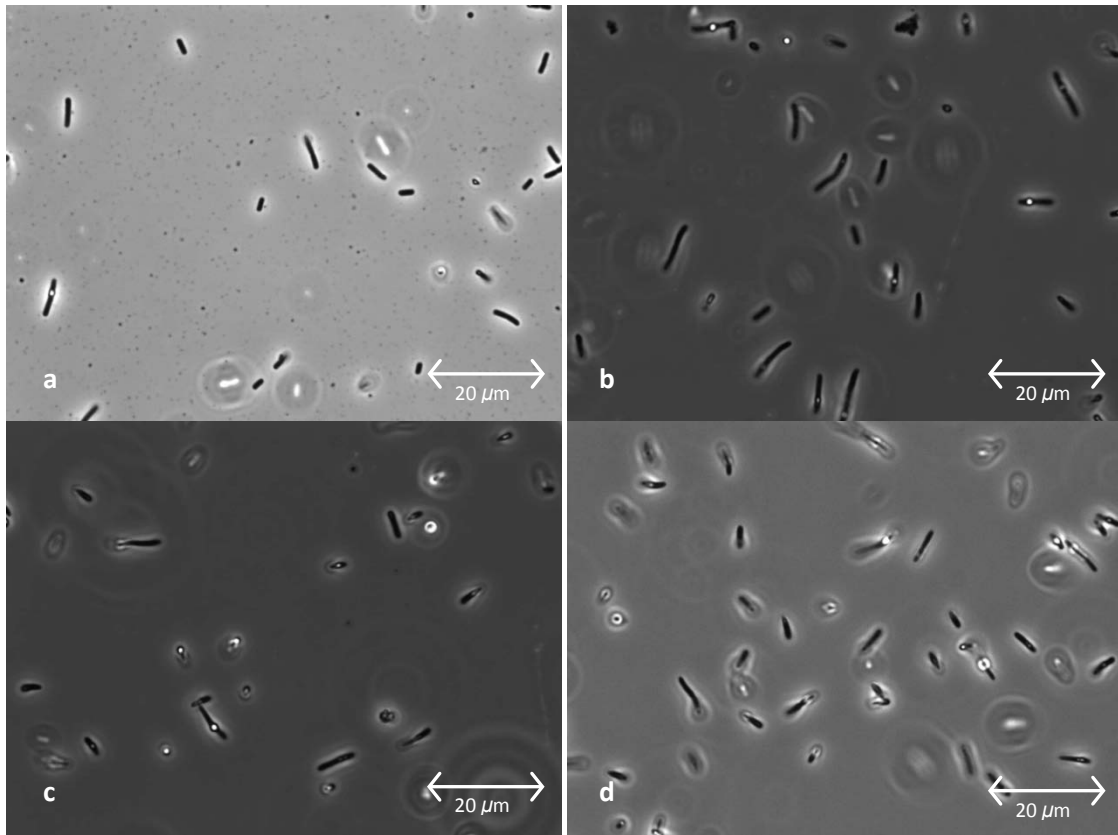
Nesta fase do trabalho procedeu-se à análise visual de imagens de amostras da experiência 1 e 2 sujeitas a quatro tipos de fixação, de modo a determinar a sua viabilidade. As imagens das Figuras Figura 3.6 Figura 3.9 são representativas da globalidade dos resultados obtidos nas observações feitas em campo claro, segundo o procedimento descrito na secção 2.3.1., sendo apresentados os resultados de 4 amostras provenientes de tempos diferentes da experiência.



**Figura 3.6 – Resultados para as amostras fixas com etanol e formaldeído, após lavagem e ressuspensão com PBS (a – 9.8 h; b – 31.5 h; c – 55.4 h; d – 57.6 h).**

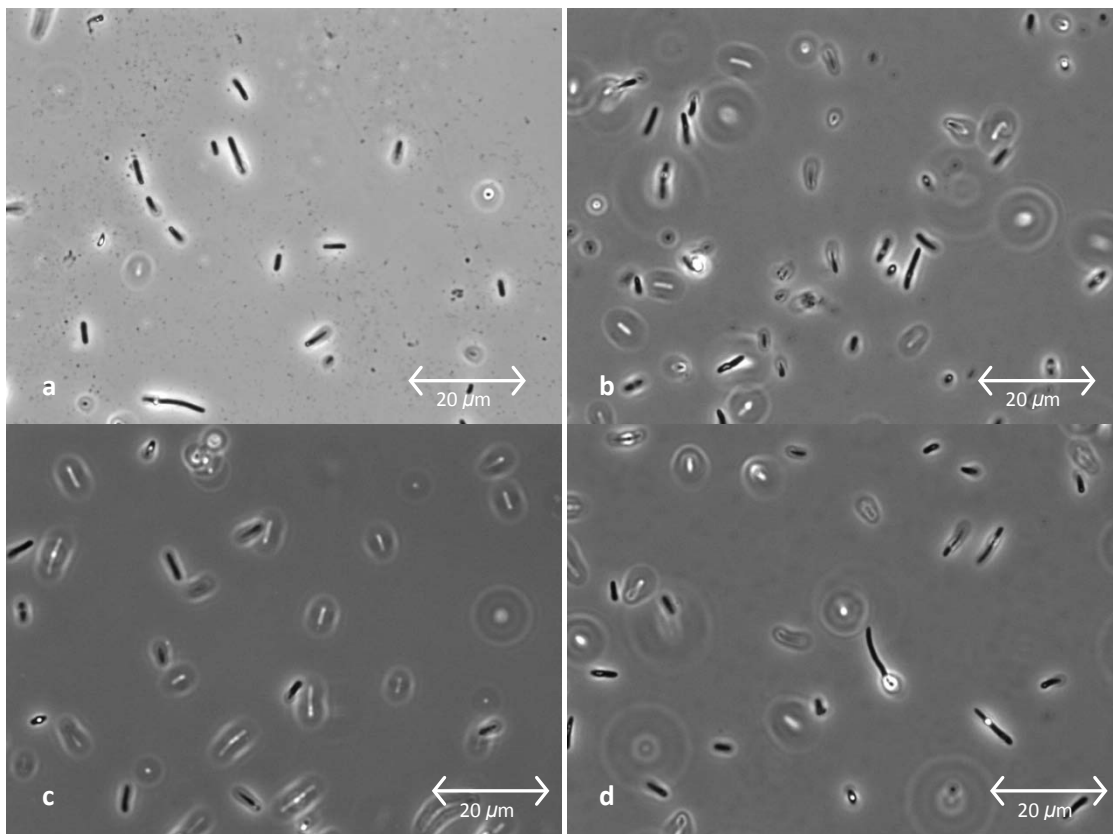
Nas amostras fixas com etanol e formaldeído, apesar de as células aparentarem um bom estado de conservação, verificou-se uma tendência acentuada para a existência de aglomeração das células, visível nas imagens *b*, *c* e *d* da Figura 3.6. Esta tendência revelou-se maior para amostras correspondentes a fases mais avançadas da experiência, não ocorrendo qualquer tipo de aglomeração para as amostras da fase inicial da experiência (imagem *a* da Figura 3.6). Desta forma, este método foi colocado de parte, uma vez que a existência de aglomeração é um factor decisivo para o insucesso de um método de análise de imagem com

vista à contabilização e caracterização de células, pois torna extremamente difícil e inconsequente o processo de segmentação de imagem.



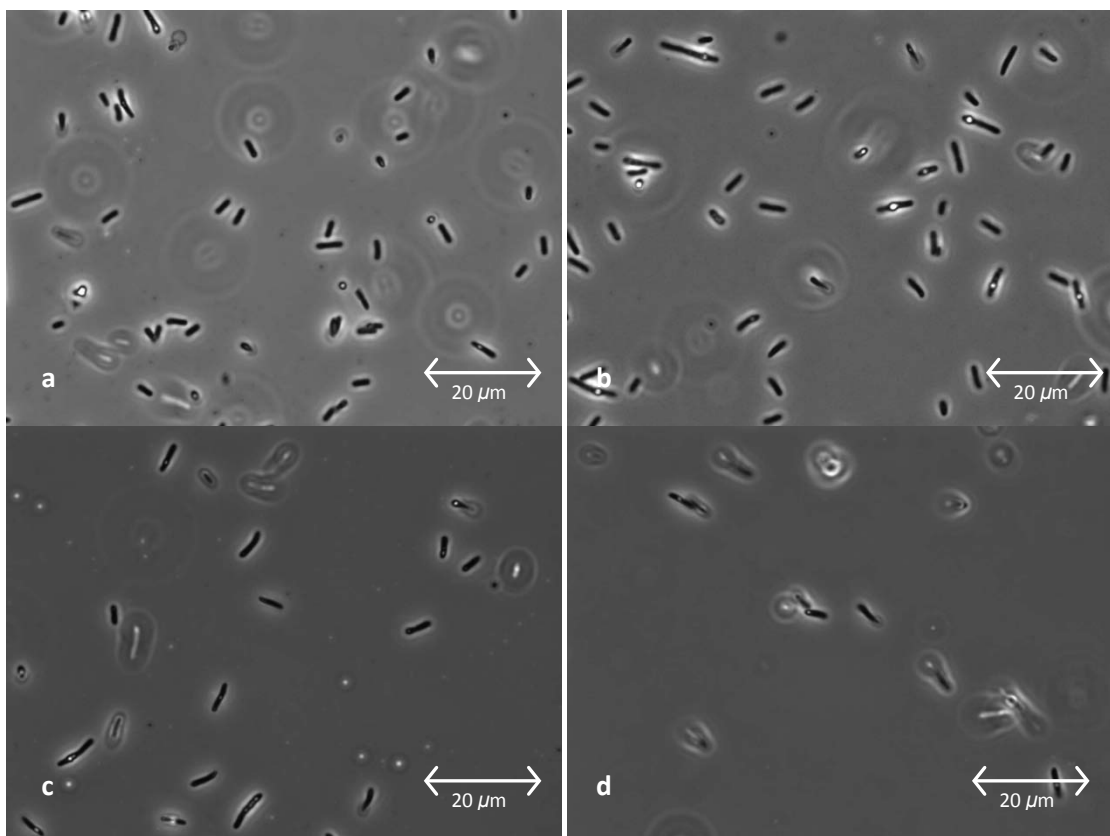
**Figura 3.7 - Resultados para as amostras conservadas com 20% de glicerol, após lavagem e ressuspensão com *PBS* (a – 9.8 h; b – 31.5 H; c – 55.4 h; d – 57.6 h).**

As amostras fixas com 20% de glicerol, sujeitas a lavagem e posterior ressuspensão com *PBS*, demonstraram uma aparente boa conservação das células, pouco ruído na imagem e a total ausência de aglomeração (Figura 3.7).



**Figura 3.8 – Resultados para as amostras conservadas com 20% de glicerol, sem lavagem nem ressuspensão (a – 9.8 h; b – 31.5 h; c – 55.4 h; d – 57.6 h).**

As amostras fixas com 20% de glicerol, sem lavagem nem ressuspensão apresentaram resultados semelhantes às anteriores (Figura 3.8), mostrando assim que, à partida, o processo de lavagem e ressuspensão em *PBS* não traz vantagens acrescidas no que diz respeito à qualidade das imagens obtidas.



**Figura 3.9 – Resultados para as amostras fixas com 5% de formaldeído, sem lavagem nem ressuspensão (a – 9.8 h; b – 31.5 h; c – 55.4 h; d – 57.6 h).**

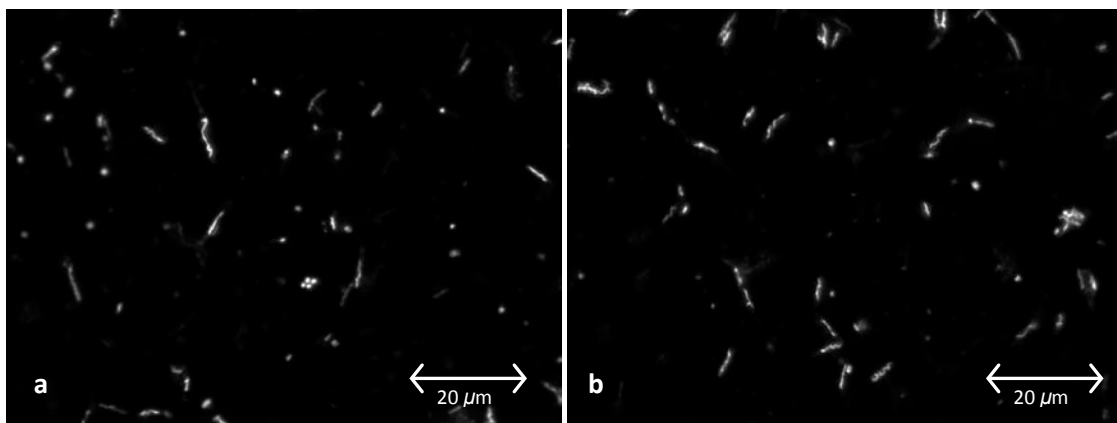
As amostras fixas com 5% de formaldeído mostraram também uma boa qualidade, no que diz respeito à conservação das células, inexistência de ruído e de aglomeração.

Tendo em conta os resultados anteriores, rejeitou-se o método de fixação com etanol e formaldeído, devido ao manifesto problema de aglomeração. De entre os outros métodos, seleccionaram-se o método de conservação com 20% de glicerol, sem lavagem e ressuspensão em *PBS*, e o método de fixação com 5% de formaldeído. O método de conservação com 20% de glicerol, com posterior lavagem e ressuspensão em *PBS* não foi seleccionado, pois apresentou resultados muito semelhantes ao método de conservação em glicerol sem lavagem em *PBS* e tem um tempo de preparação da amostra muito superior a este último.

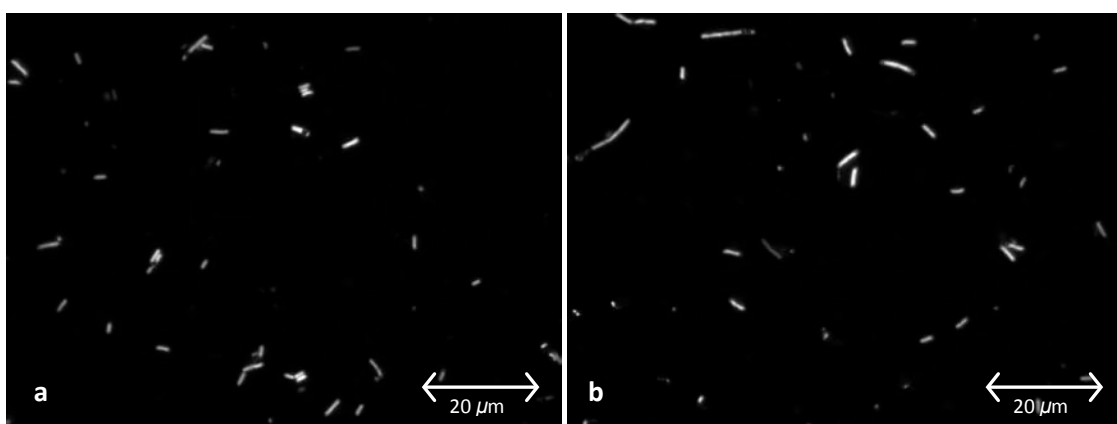
Na Figura 3.10 apresentam-se os resultados obtidos para as observações no microscópio de epifluorescência, com 10 µg/ml final de *DAPI*, com as amostras fixas com 5% de formaldeído e com as amostras conservadas com 20% de glicerol, ambas sem terem sido sujeitas a qualquer lavagem com *PBS*, e após filtração em membranas de policarbonato negro.

Analisando a Figura 3.10 observa-se claramente que as amostras conservadas com glicerol não permitem uma penetração eficaz do corante. Esta ocorrência poderá ser devida ao

facto de o glicerol não fixar efectivamente as células, agindo sim como um conservante que não as mata (Howard, 1956), não permeabilizando eficazmente a membrana celular. Já para as amostras fixas com formaldeído, a penetração do corante é muito boa, assim como a qualidade geral das imagens obtidas, onde é possível uma boa detecção das células e onde se verifica uma quantidade de ruído muito reduzida. Assim seleccionou-se o método de fixação com 5% de formaldeído como o método mais adequado para os propósitos do trabalho, pois, para além de ser o de mais rápida execução, é também aquele que permite a melhor qualidade nas imagens obtidas, a nível de diferenciação das células do fundo e da dispersão celular. Estes resultados coincidem assim com o que está referido na literatura, que inclui este método no lote dos mais utilizados com vista à conservação de células para análise de imagem (Kepner and Pratt, 1994).



**Figura 3.10** – Resultados da observação após filtração em membranas de policarbonato das amostras conservadas com 20% de glicerol coradas com *DAPI*, em que (a) e (b) representam campos diferentes.

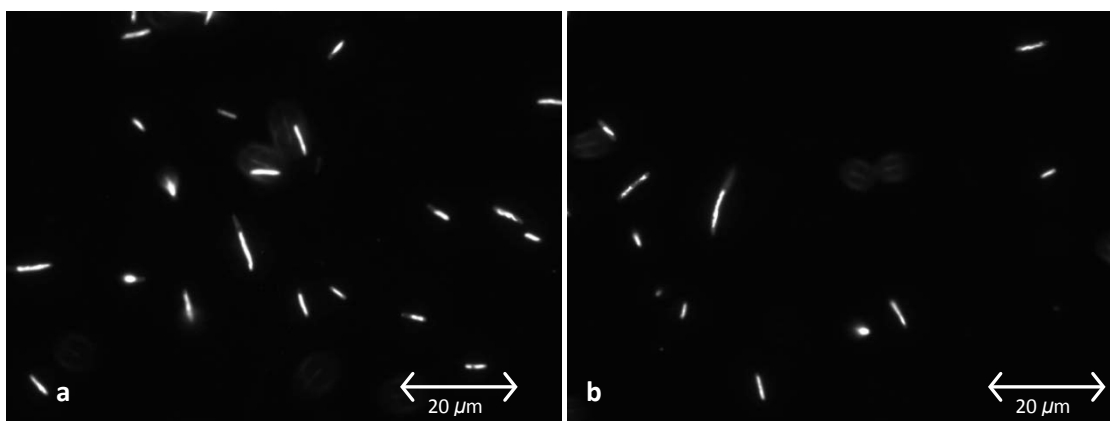


**Figura 3.11** – Resultados da observação após filtração em membranas de policarbonato das amostras fixas com 5% de formaldeído coradas com *DAPI*, em que (a) e (b) representam campos diferentes.

Durante estes testes com recurso à filtração com membranas existiram alguns problemas que foi necessário resolver de forma a obter resultados que viabilizassem as

restantes análises. Verificou-se que, por vezes, a filtração danifica algumas células, sendo por isso necessário diminuir a pressão de vácuo aplicada até um valor mínimo (tão pequeno que não é discernível o verdadeiro valor no indicador da bomba de vácuo) que permita a filtração em vez dos valores referidos na literatura (Kepner and Pratt, 1994). Ocorreu ainda a existência de bolhas de ar nas amostras após a filtração, o que as tornava heterogêneas e violava assim um requisito fundamental para se poder contabilizar células através de análise de imagem. A resolução passou pela aplicação de um filtro de papel entre a membrana de polycarbonato e o suporte do *kitasato*, de forma a homogeneizar o vácuo (Hobbie et al., 1977). A existência de bolhas de ar ocorreu também durante a fase de observação, devido á ineficaz aderência das lamelas às membranas. Desta vez o problema foi solucionado com a aplicação de óleo de imersão sobre a membrana antes de colocar a lamela (Kepner and Pratt, 1994).

Também foram observadas amostras fixas com 5% de formaldeído, mas sem recorrer à filtração em membranas, de forma a comparar com aquelas em que se efectuou a filtração em membranas. Os resultados podem ser visualizados a seguir.



**Figura 3.12 – Resultados para as amostras fixas com 5% de formaldeído observadas sem filtração, em que (a) e (b) representam campos diferentes.**

Comparando a Figura 3.11 com a Figura 3.12 verifica-se que, apesar da existência de algum ruído e da menor uniformidade do fundo nas amostras sujeitas a filtração em membranas de polycarbonato (Figura 3.11), a qualidade destas é superior em relação às amostras não sujeitas a filtração em membranas (Figura 3.12). Isto acontece porque nas amostras não filtradas as células distribuem-se por vários planos na vertical, que originam vários planos de focagem no microscópio. Desta forma quando se observa um campo nestas amostras, existem células que ficam completamente desfocadas, podendo, num caso extremo desaparecer por completo num certo plano de focagem. Outra ocorrência possível é a possibilidade de apanhar células longitudinalmente, devido à profundidade do campo. Para

um trabalho onde são essenciais a contabilização do número de células por campo e a determinação precisa das características relativas à morfologia das células, não é possível trabalhar com imagens onde não estão todas as células presentes no campo, ou onde uma grande percentagem delas está bastante desfocada, adulterando os resultados de forma significativa.

Os aspectos negativos das amostras sujeitas a filtração são explicados pelo próprio funcionamento da técnica. Assim ao filtrar e depositar as células à sua superfície, é expectável que exista ruído na imagem, pois existem detritos celulares e outros que também podem ficar retidos na superfície da membrana, e que contribuem para uma certa fluorescência de fundo. No entanto, desde que as células se evidenciem claramente do fundo da imagem e os detritos não tenham dimensões muito semelhantes às das células estes problemas são de fácil resolução, em contraste com os problemas evidenciados quando não existe filtração.

### **3.3. Desenvolvimento do método de análise de imagem.**

#### **3.3.1. A aplicação *CellC* – Resultados da segmentação de imagem**

A aplicação *CellC* foi utilizada com o objectivo de segmentar as imagens captadas pelo microscópio, para contabilizar e caracterizar volumetricamente as células. De seguida apresentam-se resultados típicos da segmentação de uma imagem para identificação e contabilização das células presentes, para amostras com diferentes concentrações de biopolímero.

Como se pode observar na Figura 3.13, o resultado da segmentação da imagem é bastante satisfatório, uma vez que as células são detectadas e não existe uma adulteração visível da forma das mesmas. Também é de salientar o facto de não se encontrar qualquer ruído no resultado da segmentação, existindo este apenas na imagem original.

No entanto para amostras com maior concentração de polímero começam a surgir algumas dificuldades, dado que o espaço ocupado pelo biopolímero aumenta, pelo que nas imagens surgem orifícios maiores dentro das células, pois o *DAPI* não colora o PHB. Estes orifícios aumentam o grau de incerteza dos resultados, uma vez que dificultam o processo de segmentação, podendo originar resultados não totalmente correspondentes à realidade (Figura 3.14).

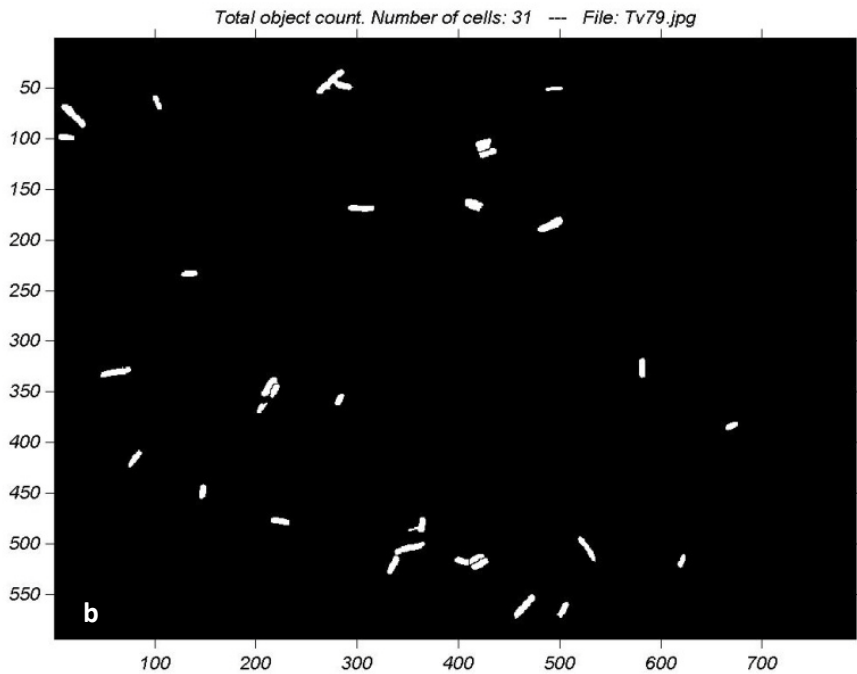
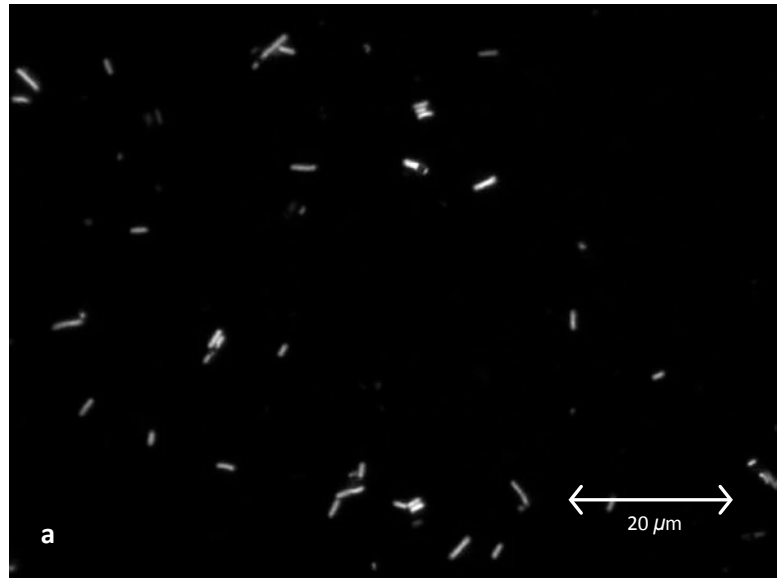
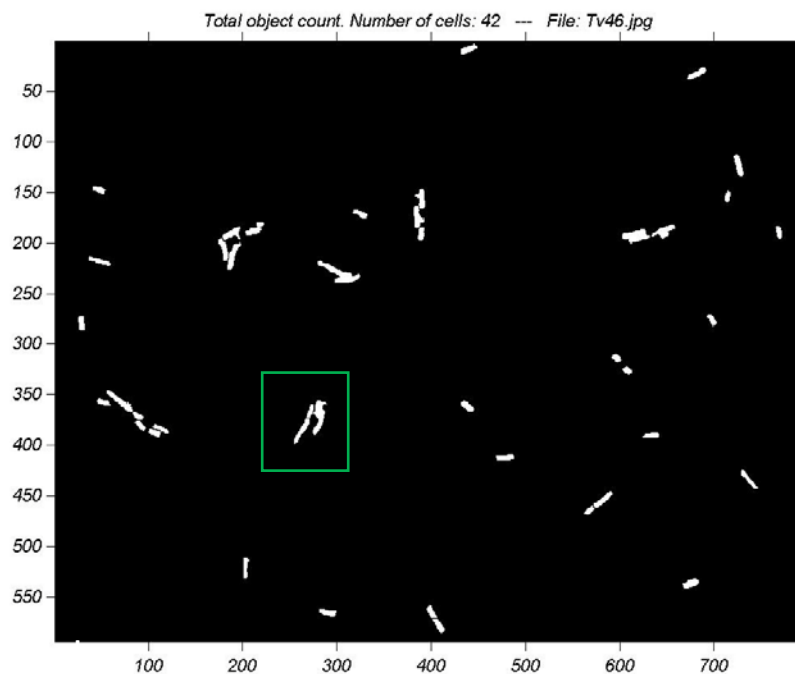
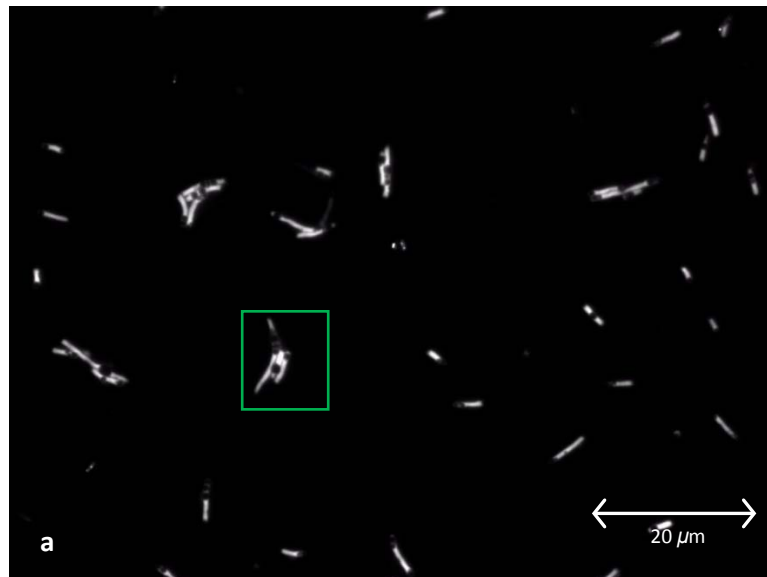


Figura 3.13 - Imagem contendo células coradas com *DAPI* (a) e resultado da sua segmentação (b) na aplicação *CellC*, para uma amostra com baixa concentração de biopolímero (amostra 1 da experiência 2 contendo 17% p/p de PHB).



**Figura 3.14 - Imagem contendo células coradas com *DAPI* (a) e resultado da sua segmentação (b) na aplicação *CellC*, para uma amostra com maior concentração de biopolímero (amostra 7 da experiência 2 contendo 25% p/p de PHB).**

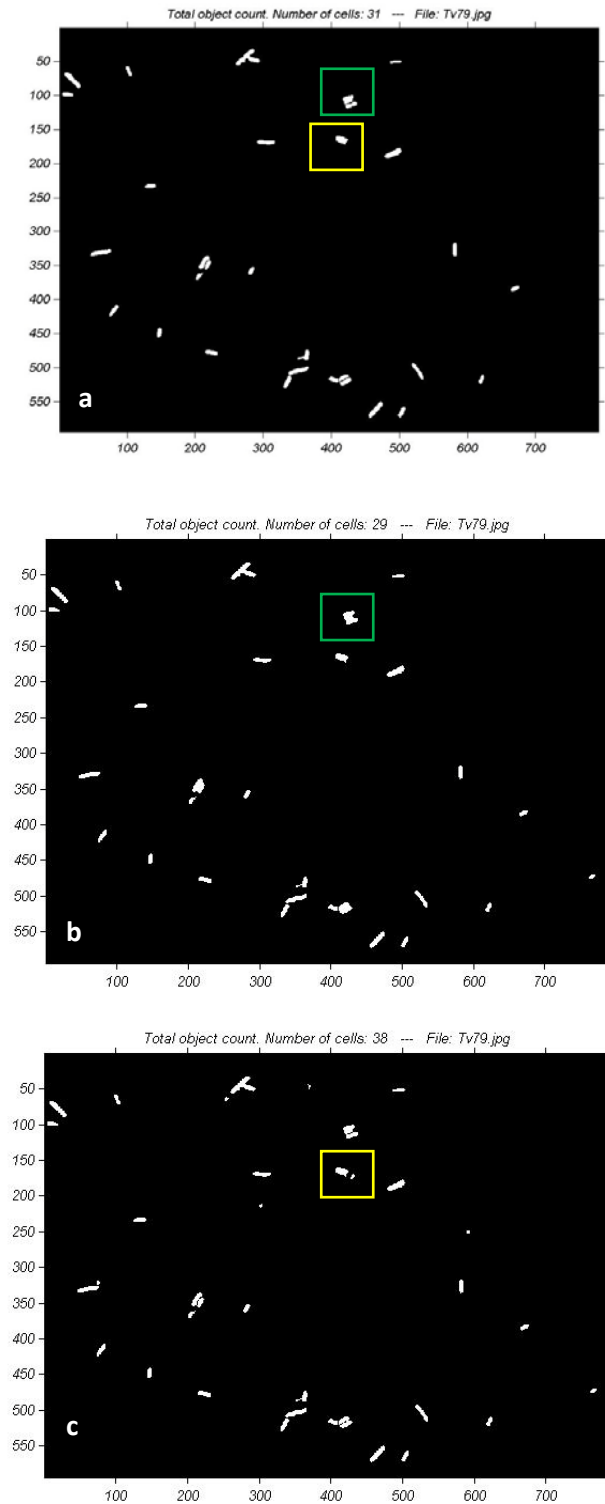
Os resultados obtidos para a segmentação das imagens e para a determinação da quantidade de células em cada imagem mostraram ser bastante sensíveis aos parâmetros da aplicação *CellC*, nomeadamente ao parâmetro para a divisão de agregados e aos parâmetros relativos à eliminação de ruído. Nas pode-se observar como ligeiras variações nos parâmetros em questão influenciam o aspecto da imagem binária resultante e a contagem do número de células. Apesar de à primeira vista poder parecer difícil afinar estes parâmetros na aplicação *CellC*, após algumas tentativas iniciais, o processo de afinação acaba por ser bastante intuitivo,

até porque a gama de valores utilizados para a obtenção de imagens binárias de boa qualidade foi sempre bastante pequena em todo este trabalho.

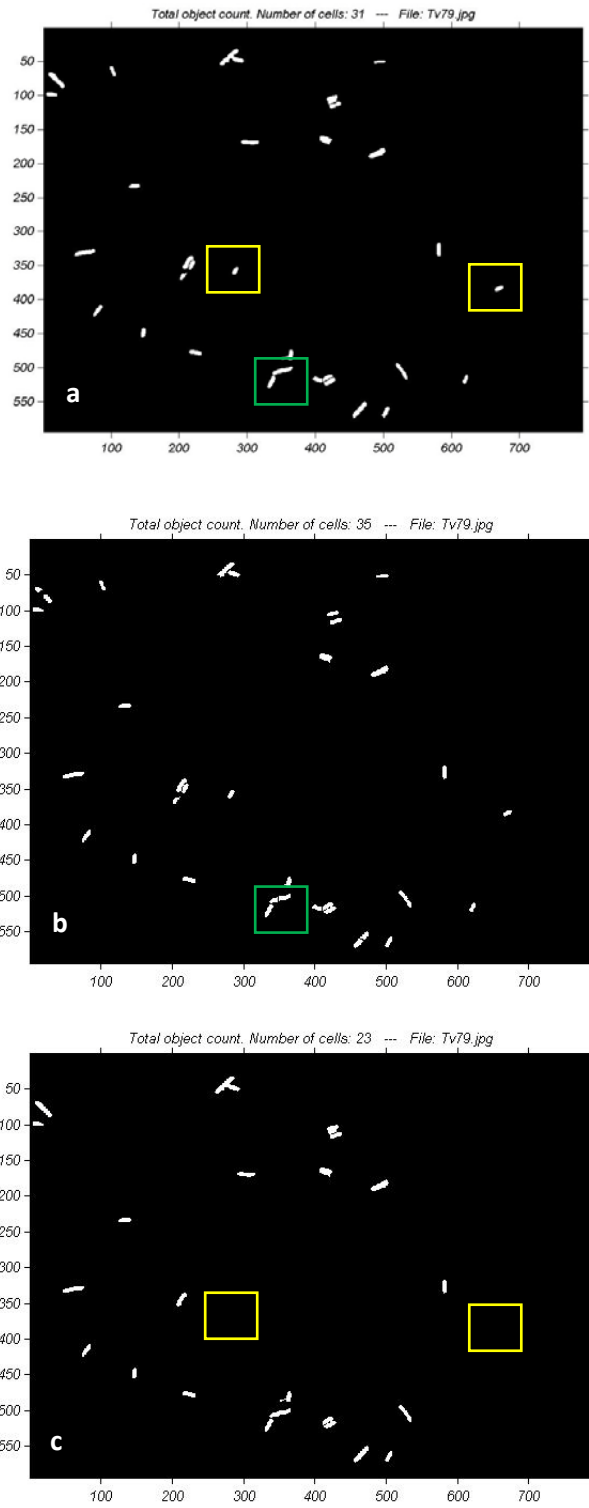
Na Figura 3.15 é possível verificar o que acontece caso se utilizem valores para os parâmetros que fiquem um pouco abaixo daquilo que a imagem em questão necessita. A imagem (a) da Figura 3.15 é aquela que foi utilizada para a quantificação da concentração celular, com um factor de separação de agregados de 0.88 e um factor de remoção de ruído que elimina todos os objectos com menos de  $0.6 \mu\text{m}^2$  de área. Na imagem (b) utilizou-se um factor de separação de agregados de 0.82, e é possível verificar que a contagem de células passou de 31 para 29 células. As caixas verdes nas imagens da Figura 3.15 evidenciam um local onde foram detectadas duas células inicialmente mas que, com a diminuição do factor de separação de agregados, passaram a ser detectadas só como uma célula. A diferença entre a imagem (c) e a imagem (a) é a utilização de um factor de remoção de ruído de  $0.2 \mu\text{m}^2$  na imagem (c) em vez dos  $0.6 \mu\text{m}^2$  usados na imagem (a). Esta alteração faz com que a contagem inicial de 31 células aumente para 38. A causa deste aumento é a presença de vários pequenos objectos que ou não correspondem a células, ou correspondem a uma pequena parte de células que contêm grãos de biopolímero, como na situação assinalada a amarelo.

Na Figura 3.16 pode-se verificar o que acontece caso os dois parâmetros da aplicação *CellC* em questão tenham valores demasiado altos para uma imagem. A imagem (a) da Figura 3.16 é a imagem utilizada para a quantificação da concentração celular, com um factor de separação de agregados de 0.88 e um factor de remoção de ruído que elimina todos os objectos menores que  $0.6 \mu\text{m}^2$ , como já foi dito. Na imagem (b) ocorre um aumento do número de objectos detectados de 31 para 35 devido à utilização de um factor de separação de 0.96. Como se pode ver na zona evidenciada a verde, existem células inteiras que são divididas em duas, contribuindo para um aumento do número de células que não tem correspondência com a realidade. Na imagem (c) existe uma diminuição do número de células detectadas de 31 para 23 células devido à utilização de um factor de remoção de ruído que elimina todos os objectos com menos de  $1 \mu\text{m}^2$  de área, eliminando as células mais pequenas, como se pode ver nas zonas evidenciadas a amarelo.

Este tipo de erros acaba sempre por acontecer, qualquer que seja o valor dos parâmetros, no entanto, uma boa afinação destes parâmetros permite minimizar as consequências desses erros.



**Figura 3.15 - Variação dos resultados obtidos para a contagem de células consoante os valores dos parâmetros de divisão de agregados e de remoção de ruído. A imagem (a) é a que foi utilizada para a quantificação da concentração celular (31 células), a imagem (b) mostra um caso de subestimação do número de células devido a um factor de separação demasiado pequeno (29 células) e a imagem (c) um caso de sobrestimação devido a um factor mínimo de remoção de ruído demasiado baixo (38 células).**



**Figura 3.16 – Outro exemplo da variação dos resultados obtidos para a contagem de células consoante os valores dos parâmetros de divisão de agregados e de remoção de ruído. A imagem (a) é a que foi utilizada para a quantificação da concentração celular (31 células), a imagem (b) mostra um caso de sobrestimação do número de células devido a um factor de separação demasiado alto (35 células) e a imagem (c) um caso de subestimação devido a um factor de remoção de ruído mínimo demasiado alto (23 células).**

Para proceder à determinação da concentração volumétrica de PHB nas células foi necessário somar as imagens relativas à observação do polímero, corado com Azul de Nilo, com as imagens relativas à restante célula, corada com *DAPI*. A Figura 3.17 mostra o aspecto da imagem resultante relativamente às imagens que lhe dão origem.

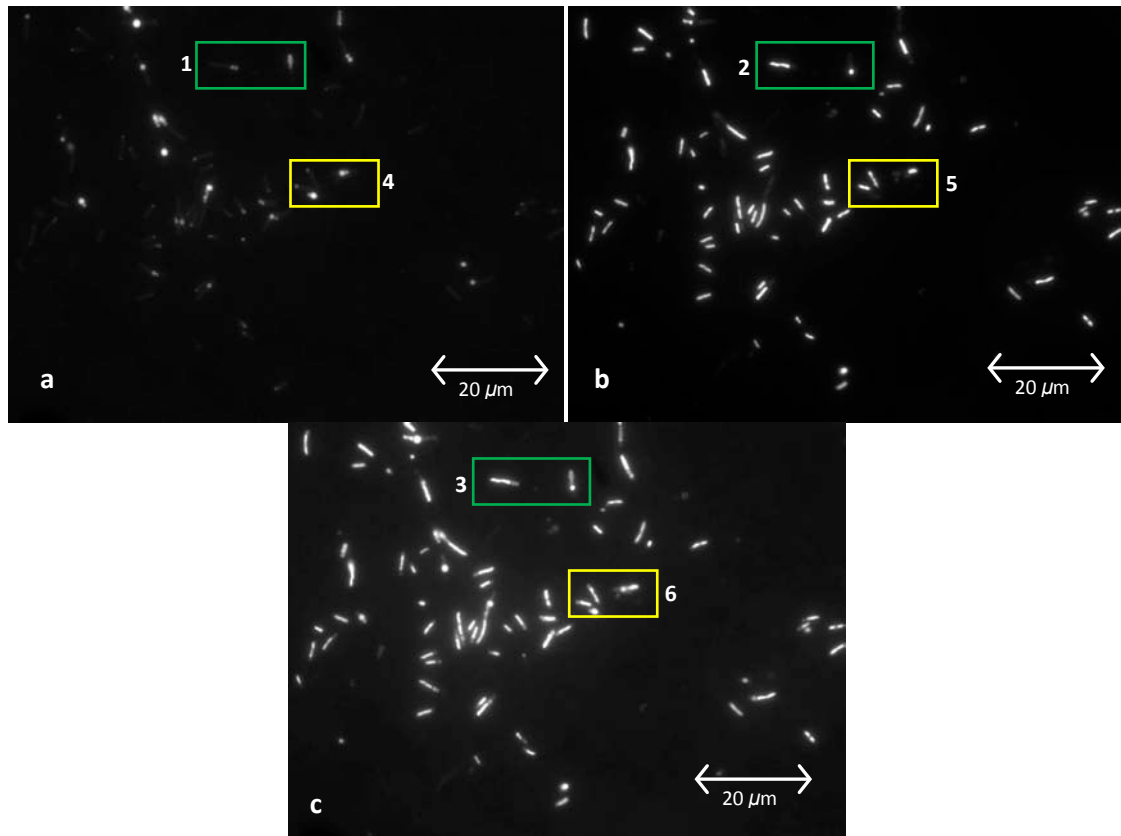


Figura 3.17 - Aspecto da imagem obtida (c) após a soma da imagem relativa ao biopolímero (a) e da imagem relativa ao resto do conteúdo celular (b). As zonas evidenciadas são apresentadas em detalhe na Figura 3.18.

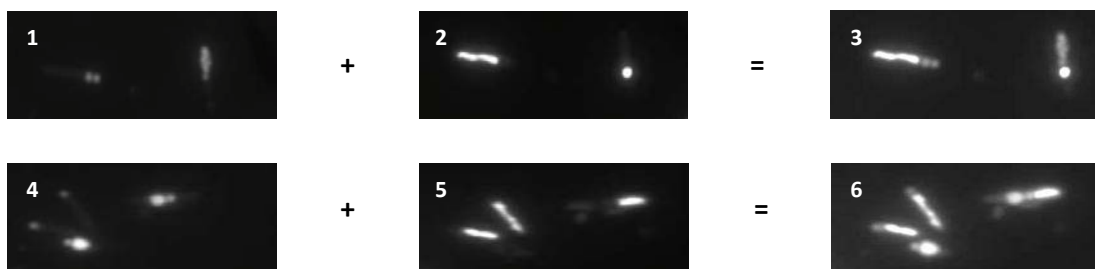


Figura 3.18 – Detalhes da Figura 3.17 em que se evidencia o processo da soma das imagens relativas ao biopolímero (1 e 4) com as imagens que contêm o restante conteúdo celular (2 e 5) e o resultado dessa soma (3 e 6).

Após uma observação cuidada da Figura 3.17 pode-se concluir que a imagem resultante da soma possui uma boa qualidade no que diz respeito aos parâmetros que a ter em conta para o processo de análise ser bem sucedido, nomeadamente a nível da ausência de ruído, da evidenciação das células e da homogeneidade do fundo. A nível da morfologia das células, existe um certo grau de adulteração, pois nas zonas fronteiriças entre os grãos de polímero e o restante conteúdo celular existe alguma indefinição, devido ao facto de o *DAPI* não penetrar tão eficazmente nessas zonas como no resto da célula, provavelmente por causa da presença do biopolímero. Só este facto por si só vai ter alguma influência sobre a acuidade dos resultados obtidos. É também evidente a necessidade de utilizar a soma das imagens pois é claramente visível na imagem (b) da Figura 3.17 e também nas imagens (2) e (5) da Figura 3.18 que o *DAPI* não consegue penetrar nas zonas onde existe biopolímero, impossibilitando a utilização destas imagens para a caracterização das células.

### **3.3.2. Determinação da curva de calibração do número óptimo de diluições em função da densidade óptica e do peso seco.**

De seguida determinou-se uma curva de calibração para o número de diluições necessárias na fase prévia à obtenção das imagens, a partir dos valores de *CDW* e de  $DO_{600nm}$  para todas as amostras observadas das experiências 2 e 3. O objectivo da obtenção desta curva de calibração é facilitar experiências futuras, pois como é necessário ter um determinado número de células por campo (20 – 100) (Pascaud et al., 2009), se for possível ter uma estimativa da diluição necessária para que isso aconteça, optimiza-se bastante o tempo dispendido na preparação da amostra para visualização, gastando também menos material e reagentes.

Para a experiência 2 a curva de calibração (Figura 3.19) obtida não mostra nenhuma tendência claramente definida. A única conclusão que se pode retirar do gráfico obtido é que, efectivamente, o número de diluições necessárias aumenta com o aumento de  $DO_{600nm}$ , no entanto o tipo de relação entre as duas grandezas não é claro.

Na experiência 3, usando os quatro pontos experimentais disponíveis, obteve-se a curva representada na Figura 3.20. Neste caso, aparentemente, existe uma relação logarítmica bem definida entre as duas grandezas. No entanto, a existência de apenas quatro pontos e a ocorrência dos problemas já descritos nesta secção durante a experiência com a consequente

diminuição do crescimento celular fazem com que esta conclusão careça de fundamentação sólida.

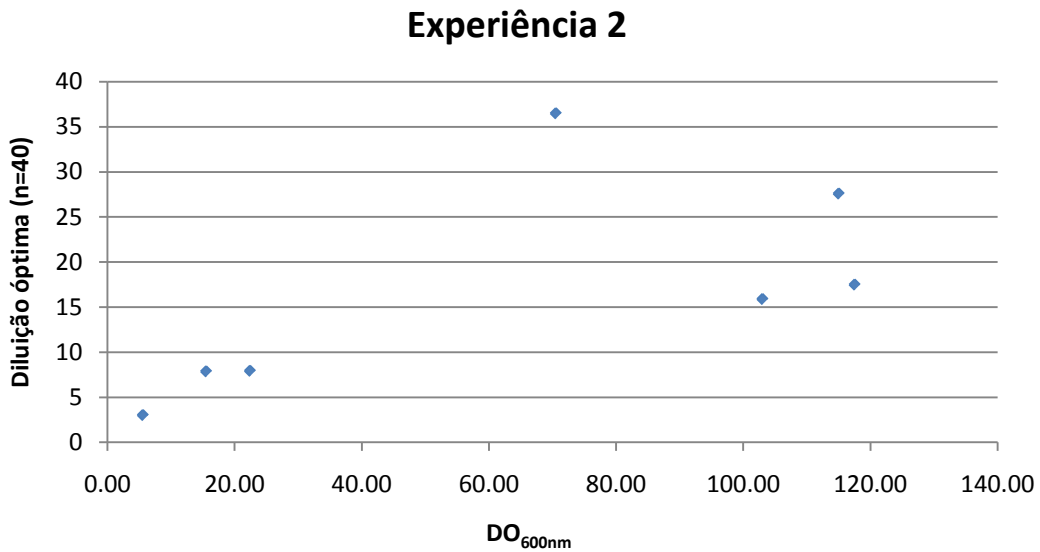


Figura 3.19 – Número de diluições a fazer em função de DO<sub>600nm</sub> para a totalidade das amostras das experiências 2.

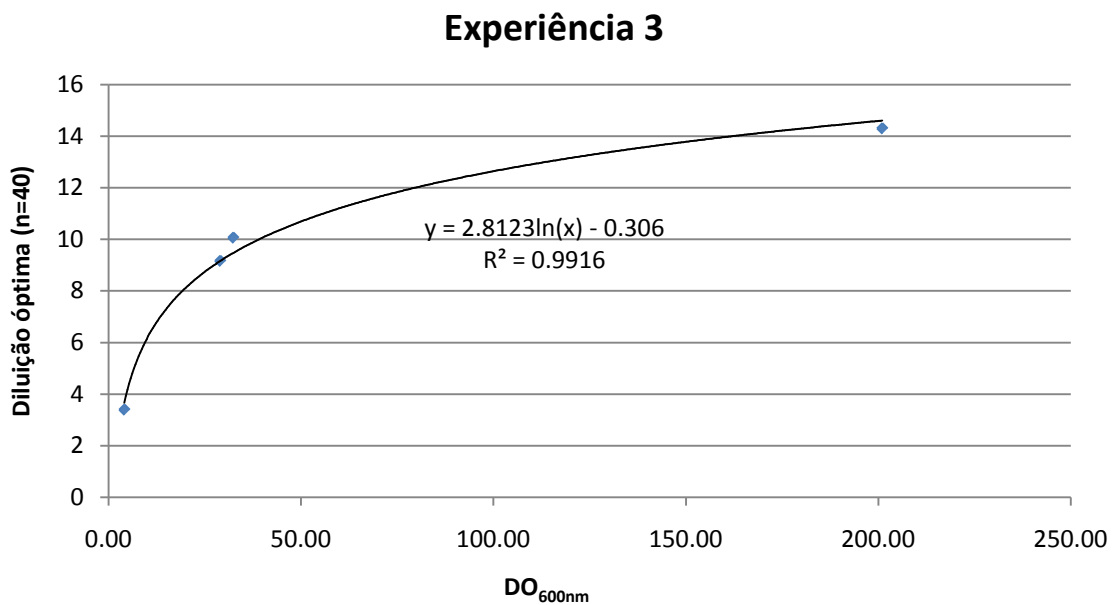
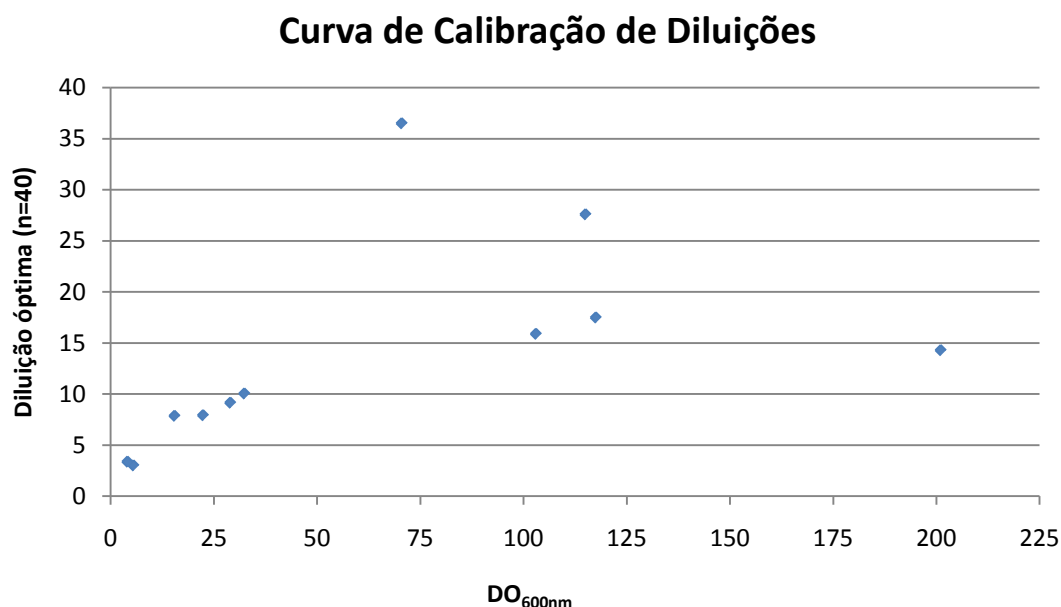


Figura 3.20 - Curva de calibração de diluições a partir de DO<sub>600nm</sub> para a totalidade das amostras das experiências 3 e respectiva regressão logarítmica.

Dado que não foi possível tirar conclusões sólidas a partir dos dados de cada uma das experiências, tentou definir-se uma relação usando todos os dados disponíveis das duas experiências em questão (Figura 3.21). Mais uma vez, não foi possível determinar uma relação

consistente entre as duas grandezas, sendo apenas possível balizar com alguma incerteza a dependência do número de diluições necessárias relativamente ao valor de  $DO_{600nm}$  medido.

No entanto uma análise mais detalhada aos primeiros seis pontos do gráfico (Figura 3.22 e Figura 3.23) permitiu outro tipo de conclusões. Assim sendo, é possível verificar que para valores de  $DO_{600nm}$  até aproximadamente 40 é possível prever com algum grau de sucesso o número diluições necessárias de forma a obter um número de células por campo dentro do definido como razoável na Secção 2.3.1. Na Figura 3.22, a regressão logarítmica efectuada aos pontos em questão ajusta-se razoavelmente, fornecendo um bom ponto de partida para outros trabalhos. Já a regressão linear apresentada na Figura 3.23 não apresenta uma correlação tão boa em relação aos pontos experimentais.



**Figura 3.21 – Número de diluições a fazer em função de  $DO_{600nm}$  para a totalidade das amostras das experiências 2 e 3.**

O mesmo tipo de estudo descrito anteriormente foi repetido, tentando-se desta vez relacionar o número de diluição a fazer com as medidas obtidas para  $CDW$ . O comportamento das curvas relativas às experiências individuais é em tudo semelhante ao descrito anteriormente para a relação com  $DO_{600nm}$ . A semelhança dos resultados era expectável à partida, uma vez que as grandezas  $DO_{600nm}$  e  $CDW$  geralmente apresentam um grau de correlação significativo.

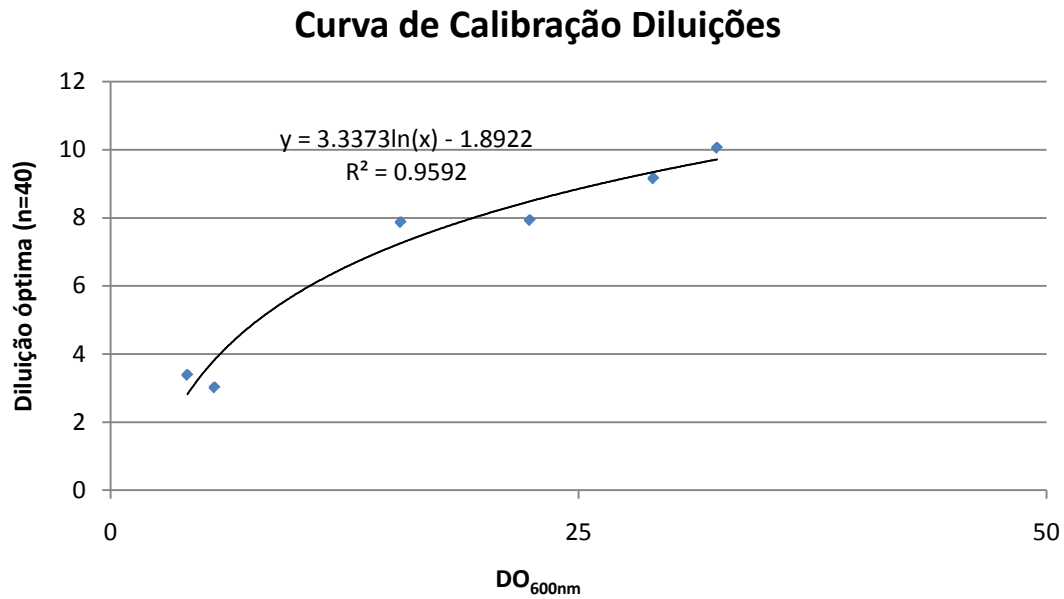


Figura 3.22 - Regressão logarítmica aos primeiros pontos da curva de calibração de diluições a partir de DO<sub>600nm</sub> (Figura 3.21).

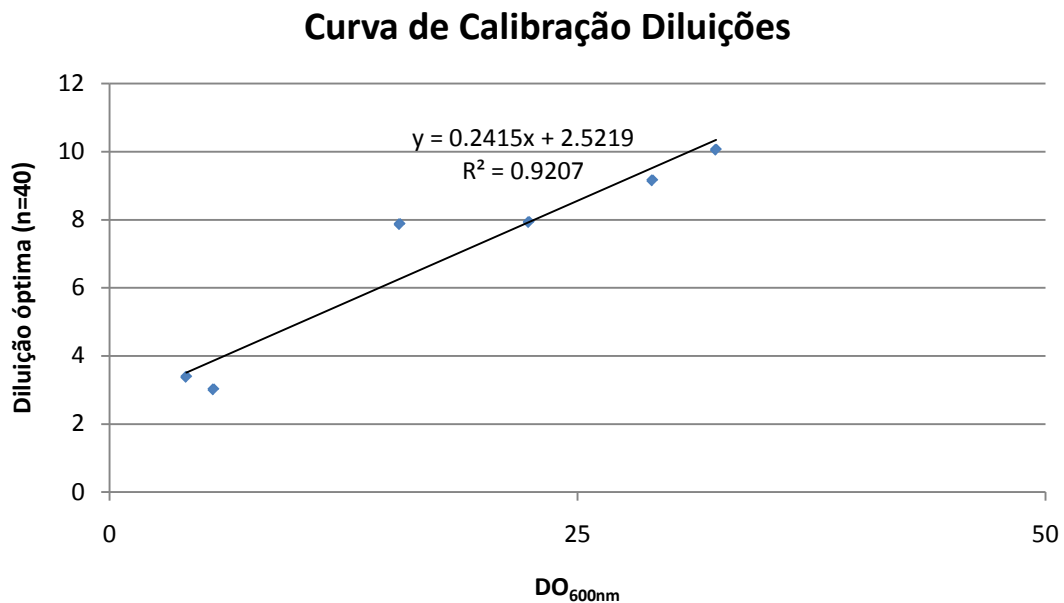


Figura 3.23 - Regressão linear aos primeiros pontos da curva de calibração de diluições a partir de DO<sub>600nm</sub> (Figura 3.21).

Neste trabalho as indicações recolhidas durante a análise das amostras da experiência 2 foram utilizadas para tentar prever as diluições necessárias fazer para as amostras da experiência 3. Verificou-se que para valores de DO<sub>600nm</sub> até cerca de 30, a diluição prevista geralmente era adequada, sendo que acima desses valores, o número de células por campo era um pouco diferente do esperado, embora fosse possível utilizar a Figura 3.21 para definir

um intervalo para o número de diluições a fazer para as amostras com  $DO_{600nm}$  superior a 30. Esta ocorrência está perfeitamente de acordo com o que se verificou na fase em que se tentou determinar relações entre as duas variáveis, atrás nesta secção.

Desta forma é importante em trabalhos futuros aprofundar este tipo de estudos, tentando trabalhar com mais pontos experimentais provenientes de experiências sem problemas de maior no que diz respeito a alterações inesperadas da concentração celular, possibilitando assim definir modelos simples de correlação que podem depois evoluir para modelos mais complexos. O importante será determinar se é possível desenvolver um modelo que consiga prever as diluições a fazer às amostras para experiências diferentes, ou se pelo contrário, só é possível fazer este tipo de previsões para experiências muito parecidas.

### 3.3.3. Determinação da concentração celular através de análise de imagem

Após a análise das imagens obtidas para as experiências 2 e 3 obtiveram-se os resultados listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Concentração celular determinada através de análise de imagem, para as experiências 2 e 3.

Amostra	Tempo (h)	Concentração Celular (n.º cel/ml)
<b>Experiência 2</b>		
t7	9.77	3.40E+09
t10	14.67	8.86E+09
t12	16.92	8.93E+09
t23	31.47	4.11E+10
t25	37.02	3.10E+10
t35	55.38	1.97E+10
t41	57.58	1.79E+10
<b>Experiência 3</b>		
t5	5.45	3.81E+09
t12	19.5	1.13E+10
t16	23.57	1.03E+10
t46	43.67	1.61E+10

Nas Figura 3.24 e Figura 3.25 , é possível observar a variação da concentração celular ao longo do tempo, para cada uma das experiências, assim como o erro associado a cada amostra.

### Experiência 2

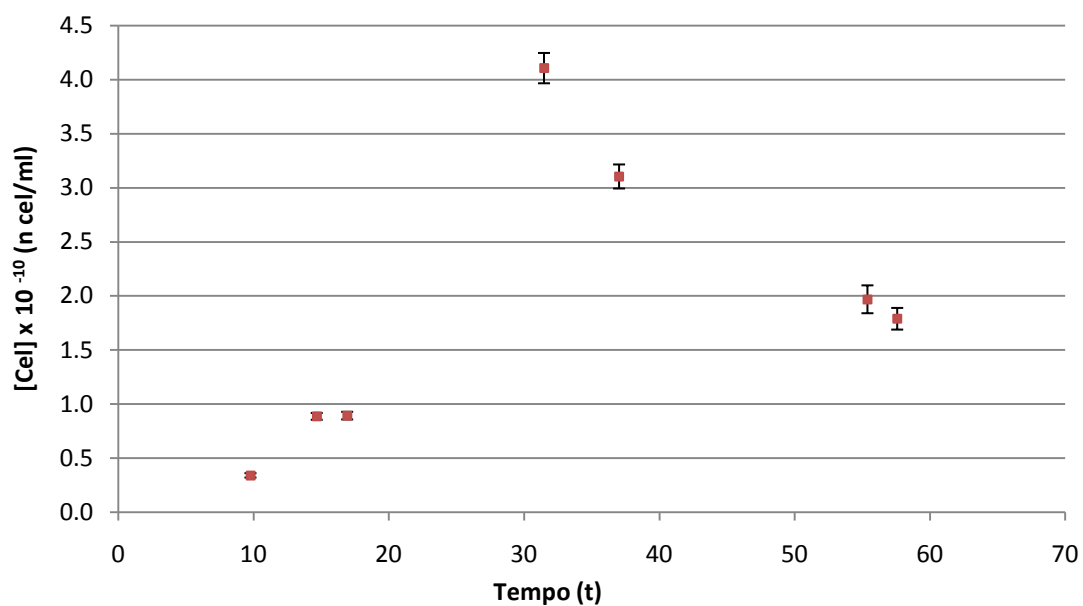


Figura 3.24 - Variação da concentração celular ao longo do tempo para a experiência 2.

### Experiência 3

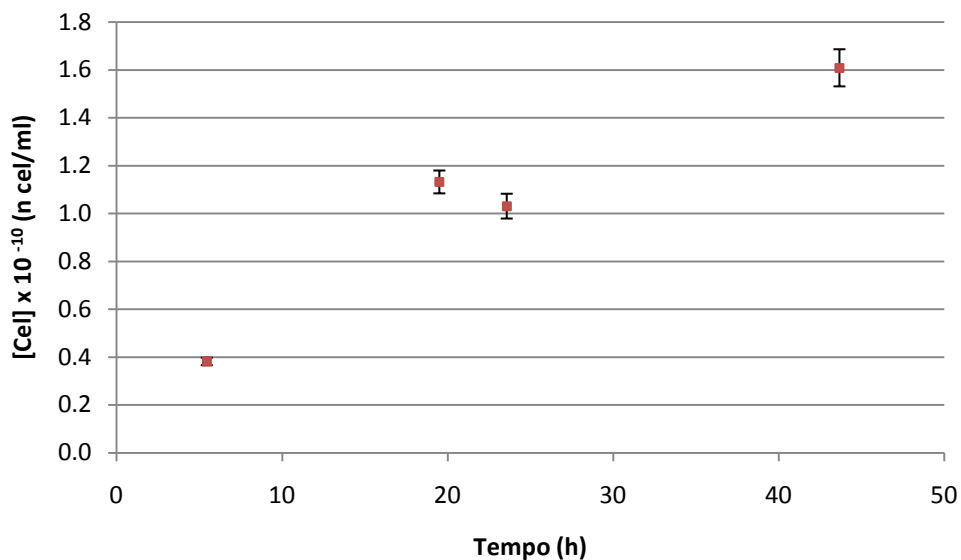


Figura 3.25 - Variação da concentração celular ao longo do tempo para a experiência 3.

Na Figura 3.24 observa-se um aumento da concentração celular até cerca das 30 horas de experiência, sendo que, a partir desse momento, se dá uma diminuição na concentração celular.

Já na Figura 3.25 observa-se uma tendência de crescimento da concentração celular durante todo o tempo da experiência, exceptuando os dois pontos centrais, entre os quais não há uma diferença significativa. É importante referir que em qualquer dos casos, o erro da estimativa não é grande o suficiente (erro médio inferior a 7%) para afectar as tendências identificadas, permitindo concluir que o método funciona desde que se trabalhe com um número suficiente de campos em cada amostra. Assim, verifica-se que os 20 campos definidos no início (Mesa et al., 2003) são suficientes para ter resultados com um erro padrão pequeno e que não invalida o método.

Após a obtenção destes resultados analisou-se o comportamento da concentração celular ao longo do tempo em conjunto com outras medidas relativas às experiências, mais precisamente, com  $CDW$  e  $DO_{600nm}$  (Pais, Tese em Curso).

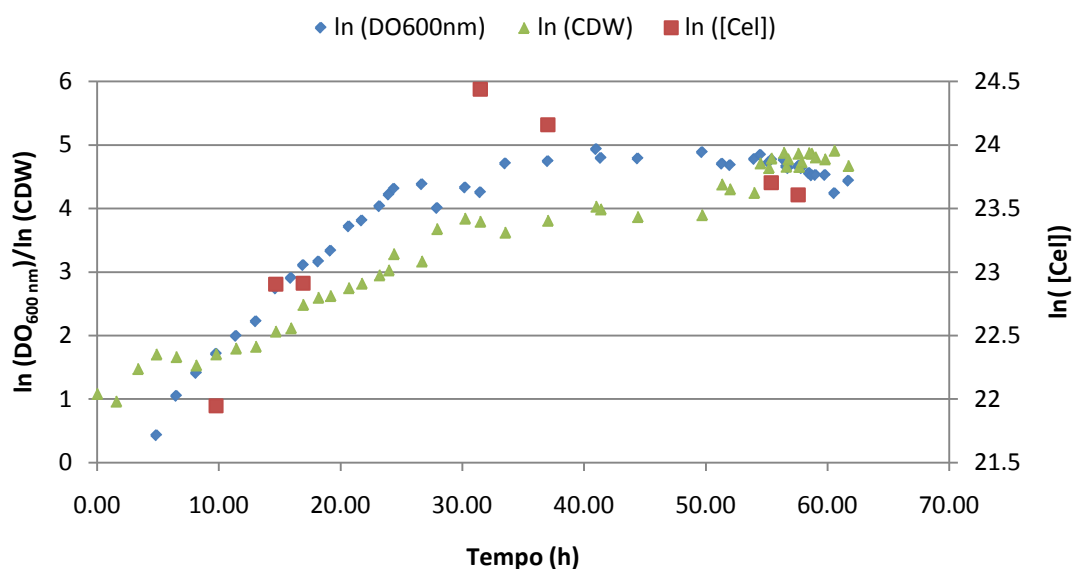
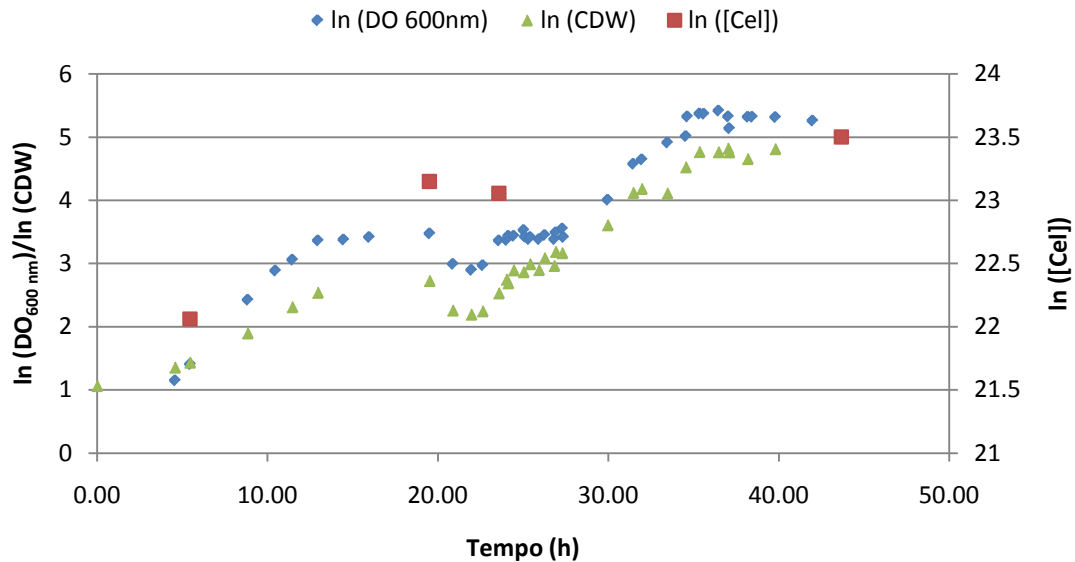


Figura 3.26 - Variação de  $\ln(CDW)$ ,  $\ln(DO_{600nm})$  e  $\ln([Cell])$  ao longo do tempo para a experiência 2.

De acordo com a Figura 3.26 e a Figura 3.27 é possível verificar que a fase de crescimento exponencial da concentração celular coincide com as fases exponenciais das restantes grandezas ( $CDW$  e  $DO_{600nm}$ ), o que indica que o método utilizado para quantificação celular funciona e é válido para as condições deste estudo.

Analisando mais detalhadamente cada experiência é possível observar que na experiência 2 (Figura 3.26) o andamento da curva da concentração celular acompanha sem grandes desvios o andamento das restantes curvas. Nesta experiência o final da fase exponencial acontece por volta das 30 horas, visível nas curvas da concentração celular e de

*CDW*. Apenas a  $DO_{600nm}$  termina a fase exponencial um pouco mais cedo, no entanto, a tendência desta curva é um pouco indefinida entre as 25-35 horas de experiência.



**Figura 3.27 - Variação de ln (CDW), ln (DO<sub>600nm</sub>) e ln ([Cel]) ao longo do tempo para a experiência 3.**

A partir do final da fase exponencial, a curva da concentração celular comporta-se de uma forma mais semelhante à curva correspondente a  $DO_{600nm}$ , mostrando, tal como esta, uma tendência para diminuir nas horas finais da experiência, ao contrário de *CDW*, que nesta fase aumenta um pouco, após uma certa estabilização nas horas antes. A falta de pontos experimentais para a concentração celular entre as 37 horas e as 55 horas não permite perceber qual a tendência que essa grandeza tem nesse espaço de tempo, ou seja, se decresce linearmente até às últimas horas, ou se se comporta como  $DO_{600nm}$  mantendo-se constante durante algum tempo e diminuindo apenas no final.

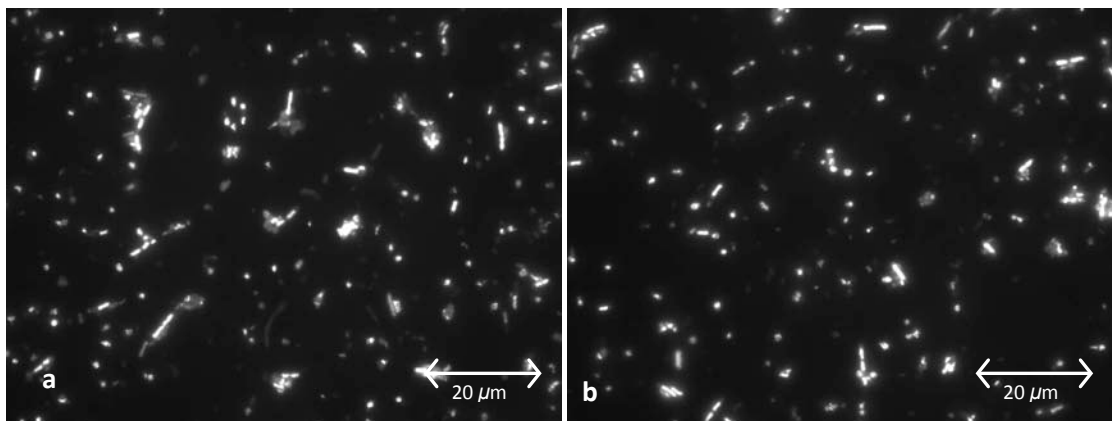
Na experiência 3, levando em conta o comportamento das curvas de *CDW* e  $DO_{600nm}$ , existe uma fase em que o crescimento celular foi interrompido e inibido, entre as 20 horas e as 25 horas. Este facto poderá ser devido a uma sobrepressão do bioreactor, que foi documentada na altura em que decorreu a experiência (Pais, Tese em Curso), e que começou a ser detectada pouco tempo antes de se verificar este comportamento. Se analisarmos o comportamento da curva da concentração celular podemos observar que também nesta fase existe uma estagnação do seu aumento, até aí evidente. Apesar de só terem sido adquiridos 4 pontos experimentais, estes encaixam na tendência evidenciada pelas outras grandezas.

É importante referir que na experiência 3, ao contrário do que aconteceu para a experiência 2, e tal como já foi referido na secção 2.3, as amostras não foram tratadas em condições de esterilidade, e que esse facto não se mostrou relevante para a qualidade das imagens obtidas e que também não foi identificada qualquer contaminação das amostras. O facto de não ser impreterível trabalhar em condições de esterilidade permite que se tratem amostras de forma ainda mais rápida.

Nesta fase do trabalho definiu-se como prioridade estudar mais experiências, no sentido de estudar a reprodutibilidade dos resultados e do método utilizado. Assim analisaram-se amostras provenientes de mais duas experiências, as experiências 4 e 5. No entanto, ocorreram problemas que impossibilitaram a obtenção de resultados que pudessem ser utilizados.

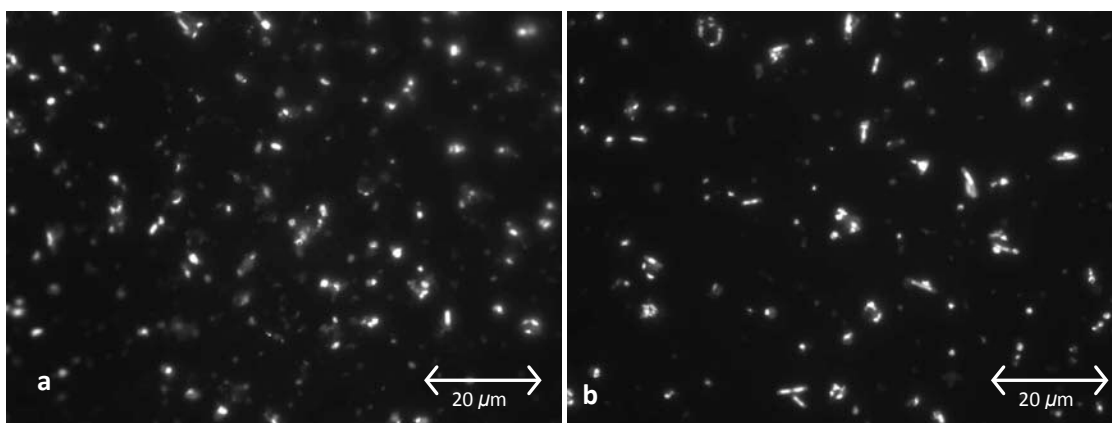
Na experiência 5, existiu uma acumulação de biopolímero superior às verificadas nas experiências anteriores (mais de 30% p/p para a maioria das amostras - resultados em Anexo) que provavelmente contribuiu para um aumento da fragilidade das células. No entanto não foi totalmente esclarecido se essa seria a causa da fragilidade das células, pois esta também pode ter sido provocada por excesso de metabolitos no interior ou no exterior das células ou pelo excesso de lactose no meio. No final da experiência foi possível verificar através da inspecção visual do bioreactor a existência de deposição de detritos originados pela lise celular no fundo do reactor, mostrando que a grande maioria das células já estava destruída. Este facto impossibilitou a obtenção de imagens passíveis de ser analisadas, sendo que dois exemplos do que se observou para estas amostras podem ser observado na Figura 3.28. Como se pode verificar, é quase impossível individualizar uma célula no meio de toda a débris celular que se encontra nas imagens, o que tornou impraticável a sua contabilização, caracterização ou qualquer outro tipo de análise através de análise de imagem.

A maior acumulação de biopolímero pode ser uma justificação insuficiente para os resultados obtidos, pois mesmo nas amostras com menor concentração as células não resistiram aos métodos utilizados, nomeadamente ao processo de filtração, e que já tinham fornecido resultados bem mais satisfatórios. No entanto, não foi possível verificar qual a razão concreta que provocou o aumento de fragilidade das células mesmo nas amostras com menos biopolímero. Colocou-se a hipótese de ser resultado de uma fixação ineficaz, devida a uma degradação do agente fixante (formaldeído), mas uma observação das amostras com menos biopolímero sem recurso a filtração nem fluorescência permitiu descartar esta possibilidade, uma vez que se verificou que as células mantinham a sua integridade.



**Figura 3.28 – Resultados das observações realizadas a amostras da experiência 5.**

Na experiência 4 os resultados obtidos foram bastante semelhantes aos verificados para a experiência 5 (Figura 3.29), no entanto as causas dos mesmos foram distintas dado que nesta experiência não existiu uma acumulação de biopolímero superior às verificadas nas experiências 2 e 3, pois apesar de não existirem valores para amostras observadas, amostras posteriores nunca ultrapassaram os 40% em polímero. Neste caso suspeita-se que uma descongelação ocorrida no congelador onde as células foram conservadas até à observação terá originado uma degradação das células que as terá enfraquecido até ao ponto de não resistirem ao processo de filtração. De resto, não foi possível determinar outras causas que explicassem os resultados observados.

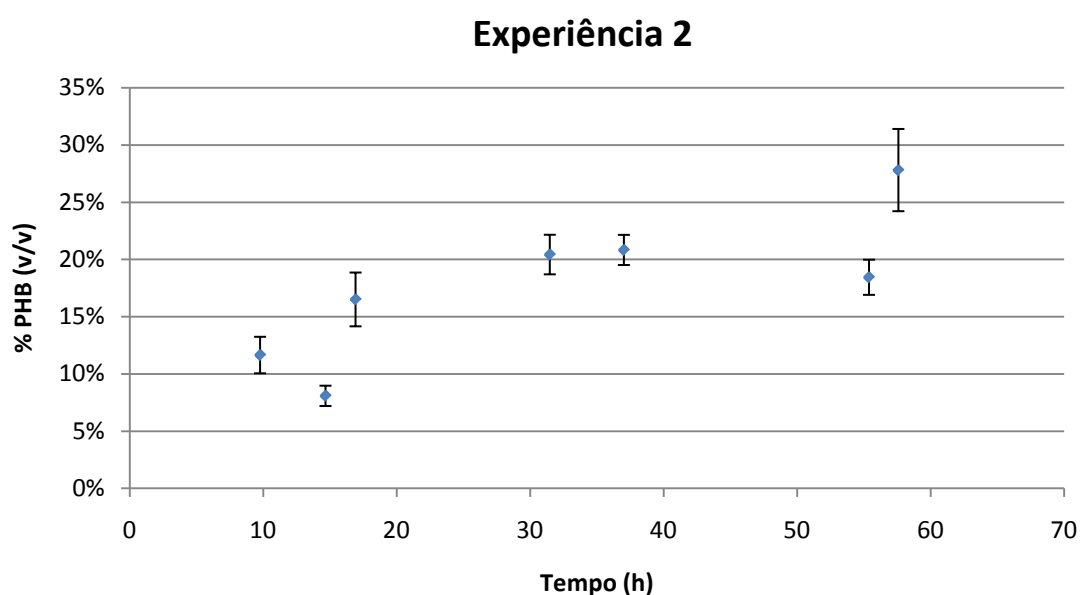


**Figura 3.29 - Resultados das observações realizadas a amostras da experiência 4.**

### 3.3.4. Determinação da concentração de PHB através de análise de imagem

Após o processamento na aplicação *CellC* das imagens relativas ao biopolímero e das imagens originadas pela soma, obtiveram-se os seguintes resultados para a concentração volumétrica de polímero.

A Figura 3.30 mostra que não existe uma tendência definida para a variação da concentração volumétrica de PHB ao longo da experiência 2, embora pareça que após uma fase de aumento mais pronunciado nas primeiras 20 horas, a concentração se manteve mais ou menos constante ao longo da experiência.

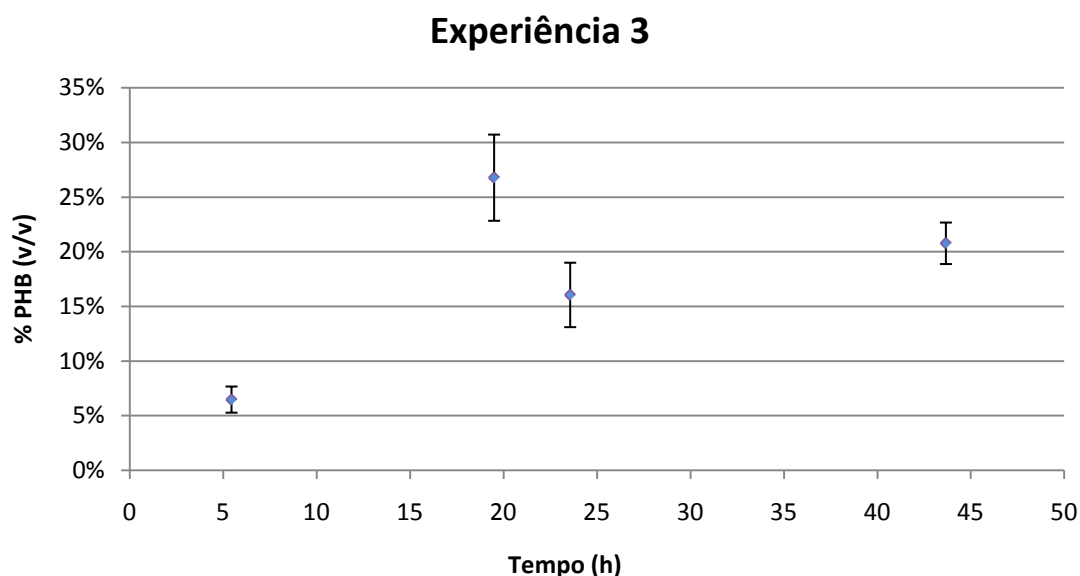


**Figura 3.30 - Variação da concentração volumétrica de PHB, determinada por análise de imagem, ao longo do tempo para a experiência 2.**

Na experiência 3 (Figura 3.31) também não existe uma tendência definida para o comportamento da concentração volumétrica de PHB.

Um aspecto importante que pode ser retirado da Figura 3.30 e da Figura 3.31 é que o erro padrão na grande maioria dos pontos não é significativo (o erro médio é 2%), o que permite afirmar que se pode quantificar a concentração volumétrica de PHB nas células através deste método e que a observação de 10 pares de imagens é suficiente. No entanto, o facto de existirem alguns pontos com um erro associado maior em ambas as experiências pode indicar que no futuro poderá ser importante estudar condições que permitam obter mais pares de imagens, o que implica mais cuidados no que diz respeito à conservação da

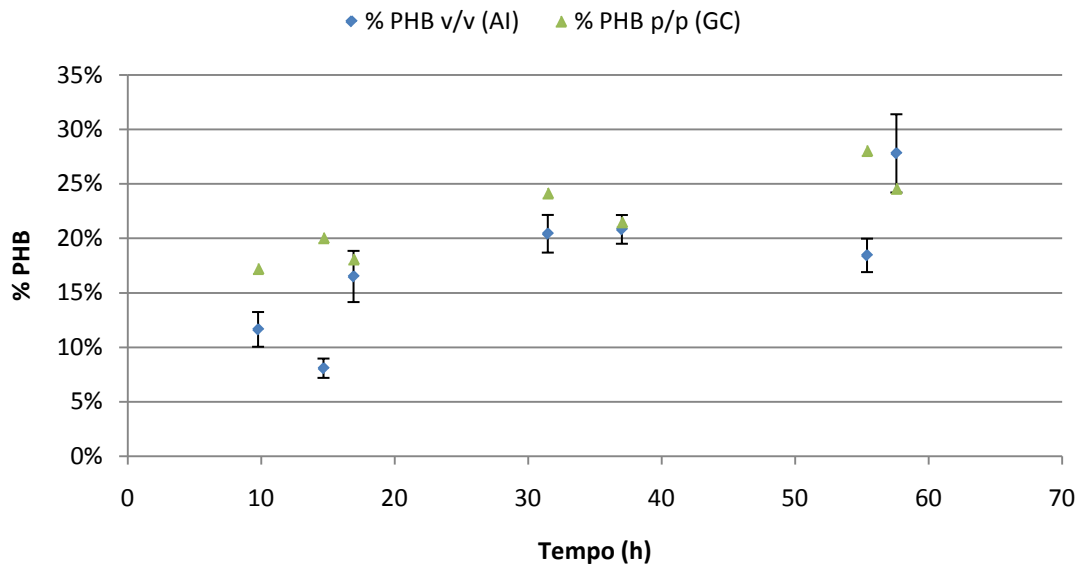
fluorescência dos corantes utilizados, pois é necessário depender mais tempo ao microscópio para adquirir as imagens.



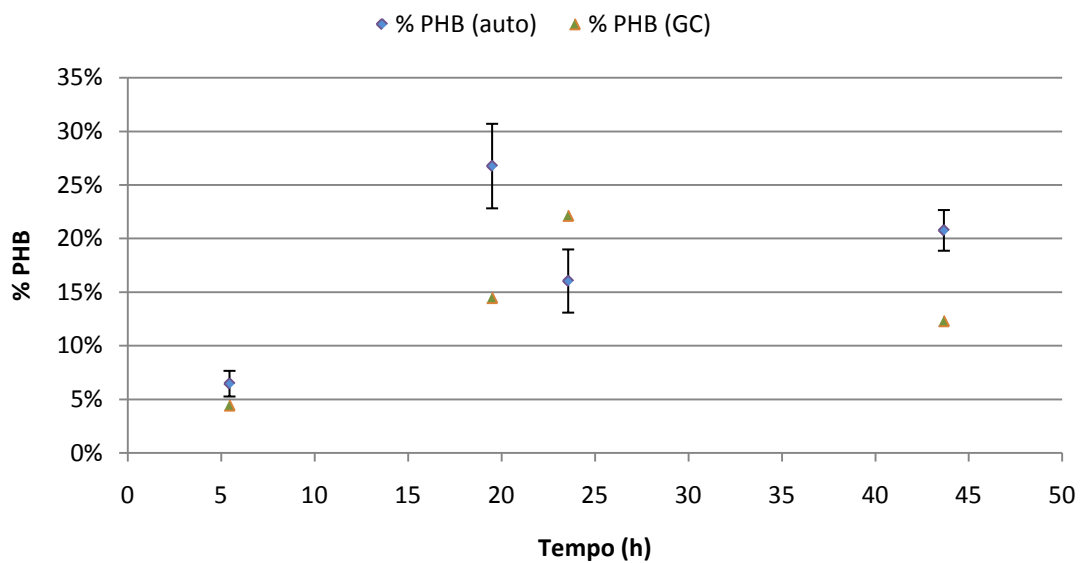
**Figura 3.31 - Variação da concentração volumétrica de PHB, determinada por análise de imagem, ao longo do tempo para a experiência 3.**

Para tentar perceber se existiria uma possível relação entre a concentração volumétrica obtida através de análise de imagem com a concentração mássica obtida por cromatografia gasosa (Pais, Tese em Curso), representaram-se ambas em função do tempo (Figura 3.32 e Figura 3.33).

Devido à impossibilidade de garantir que a densidade do biopolímero e a densidade das células se mantêm constantes ao longo do tempo da experiência, assim como a inexistência de literatura sobre a sua possível variação, qualquer tentativa de relacionar as duas medidas de concentração de biopolímero disponíveis pode ser incorrecta. No entanto, assumindo que não existem grandes variações nas densidades referidas, o que é razoável, esperar-se-ia à partida que o comportamento de ambas as concentrações fosse semelhante ao longo do tempo. Analisando tanto a Figura 3.32 como a Figura 3.33 é possível verificar que cerca de metade dos valores referentes à concentração mássica obtida por cromatografia gasosa são semelhantes ou estão no intervalo do erro em relação aos valores de concentração volumétrica obtidos por análise de imagem. No que diz respeito às tendências evidenciadas pelas curvas de ambas as concentrações nas duas experiências, ficou demonstrado que o andamento da concentração volumétrica é idêntico ao andamento da concentração mássica.



**Figura 3.32 - Variação das concentrações volumétrica e mássica de PHB ao longo do tempo para a experiência 2.**



**Figura 3.33 - Variação das concentrações volumétrica e mássica de PHB ao longo do tempo para a experiência 3.**

As imagens que são obtidas nesta fase do trabalho podem ainda servir para analisar o decorrer de experiências semelhantes, no que diz respeito à distribuição da acumulação de PHB na população celular, o que permite tirar conclusões acerca da viabilidade da experiência.

### 3.3.5. Caracterização das células através de análise de imagem

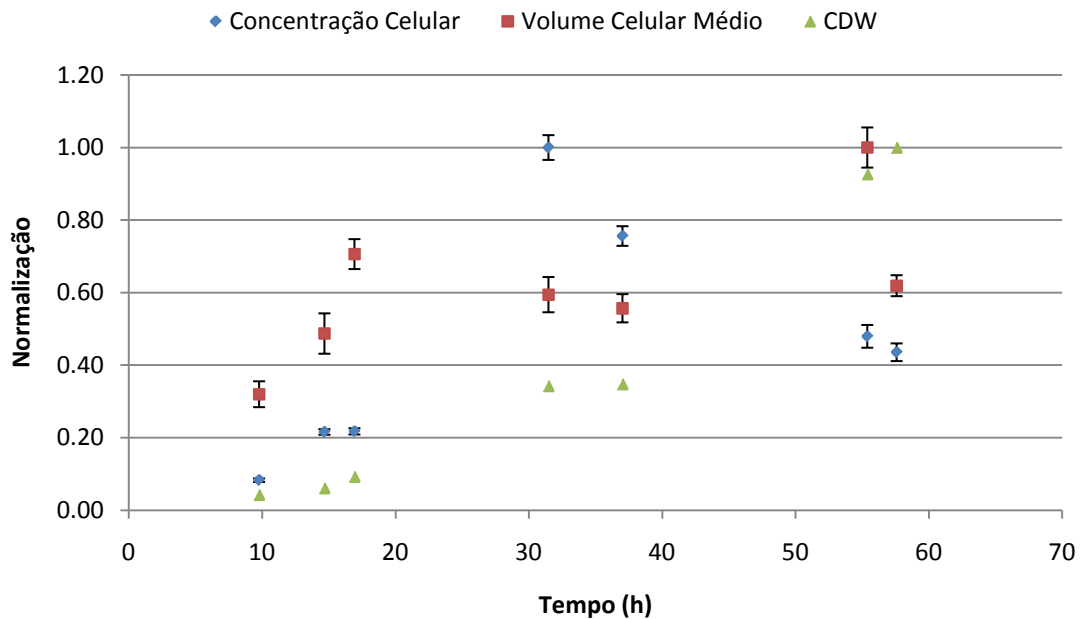
A Tabela 3.2 apresenta os resultados obtidos para a caracterização das células através de análise de imagem.

Tabela 3.2 - Resultados da caracterização das células através de análise de imagem.

Amostra	Tempo (h)	Volume Celular Médio ( $\mu\text{m}^3$ )	Biovolume ( $\text{cm}^3 \text{ cel}/\text{dm}^3$ )
<b>Experiência 2</b>			
t7	9.8	0.68	2.30
t10	14.7	1.03	9.15
t12	16.9	1.50	13.36
t23	31.5	1.26	51.73
t25	37.0	1.18	36.64
t35	55.4	2.12	41.72
t41	57.6	1.31	23.47
<b>Experiência 3</b>			
t5	5.5	0.92	3.50
t12	19.5	0.63	7.18
t16	23.6	1.01	10.38
t46	43.7	1.29	20.75

A Figura 3.34 e a Figura 3.35 apresentam a evolução do peso seco, do volume celular e da concentração celular ao longo do tempo para as experiências 2 e 3. O objectivo da representação destas três grandezas simultaneamente é tentar perceber como se influenciam umas às outras de forma a compreender mais aprofundadamente a relação entre a concentração celular e *CDW*.

Analisando a Figura 3.34, é possível verificar que numa primeira fase, correspondente aos três primeiros pontos experimentais, o aumento de *CDW* é sobretudo devido a um aumento do volume celular médio. Nos dois pontos seguintes existe um decréscimo do volume celular médio, no entanto o grande aumento verificado a nível da concentração celular explica o porquê de *CDW* aumentar. No penúltimo ponto ocorre também uma relação lógica entre as grandezas dado que, apesar da diminuição da concentração celular, o aumento do volume celular médio explica o aumento verificado em *CDW*. Apenas no último ponto experimental as grandezas em questão não se comportam de forma coerente com os restantes, pois o valor de *CDW* é muito superior ao expectável para os valores correspondentes de concentração celular e volume celular médio.



**Figura 3.34 - Variação do volume celular médio, *CDW* e concentração celular ao longo do tempo para as amostras da experiência 2.**

Para a experiência 3 (Figura 3.35) a existência de poucos pontos experimentais não permite uma análise tão detalhada como a efectuada anteriormente, embora as grandezas em questão se comportem de forma coerente nos pontos experimentais analisados. No entanto, o único factor de aumento de *CDW* evidente neste caso é a concentração celular, uma vez que o volume celular médio não varia significativamente nos três primeiros pontos experimentais.

De seguida verificou-se se a acumulação de PHB e o volume celular médio teriam alguma relação específica (Figura 3.36 e Figura 3.37). Foi utilizada a concentração mássica de PHB obtida por cromatografia gasosa por se tratar de um método já estabelecido e comprovado em detrimento da análise de imagem que ainda carece de validação. Se para a experiência 2 (Figura 3.36) o aumento de PHB parece estar relacionado com o aumento do volume celular médio, ou vice-versa, já para a experiência 3 (Figura 3.37) a distribuição dos poucos pontos experimentais não permite concluir a existência de qualquer relação entre as duas grandezas. No entanto, isto pode apenas indicar, por exemplo, que na experiência 3, o crescimento celular ocorreu de uma forma diferente do crescimento celular na experiência 2. É exactamente neste tipo de análise que o estudo da variação do volume celular ao longo de uma fermentação pode ser importante, ou seja, na caracterização das fases de crescimento da cultura, e na sua relação com a forma como uma fermentação decorre, tendo em conta o seu propósito.

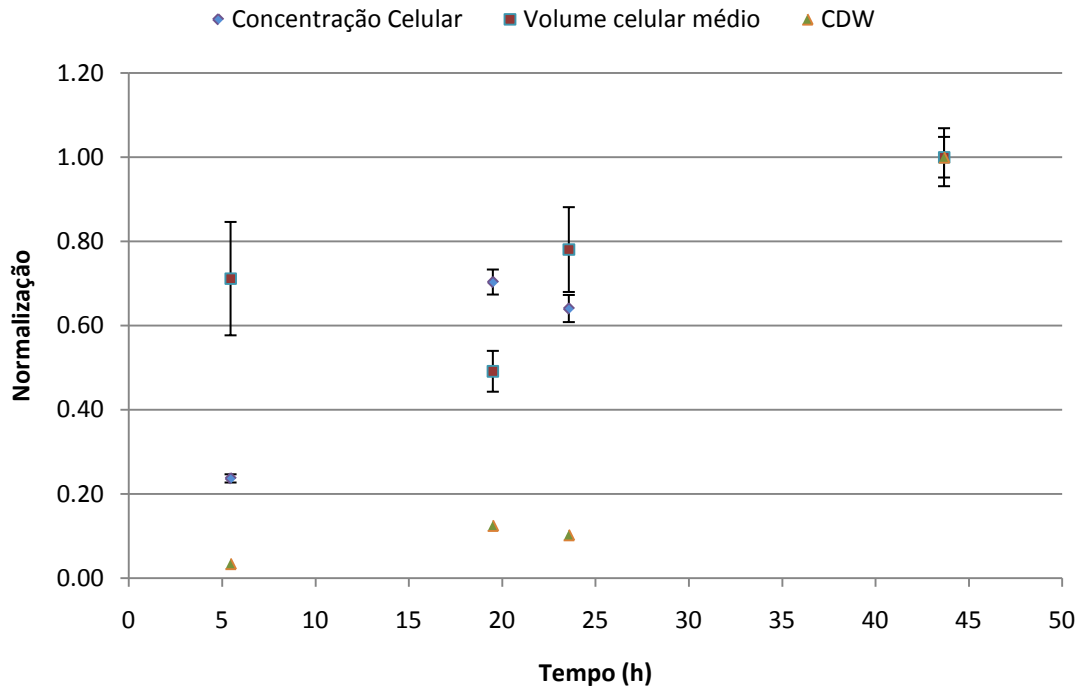


Figura 3.35 - Variação do volume celular médio, *CDW* e concentração celular ao longo do tempo para as amostras da experiência 3.

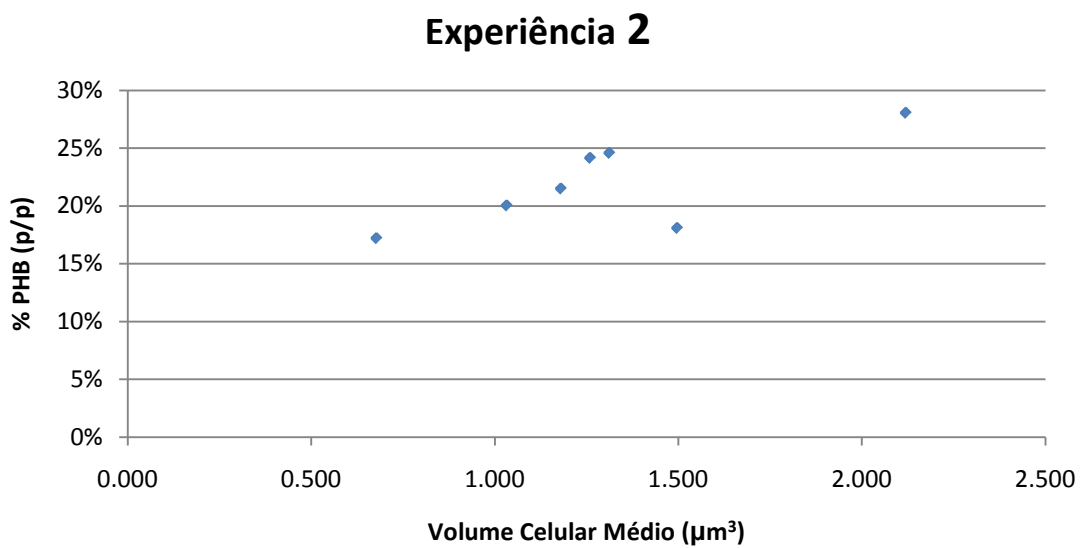


Figura 3.36 - Variação da % mássica de PHB em função do volume celular médio para a experiência 2.

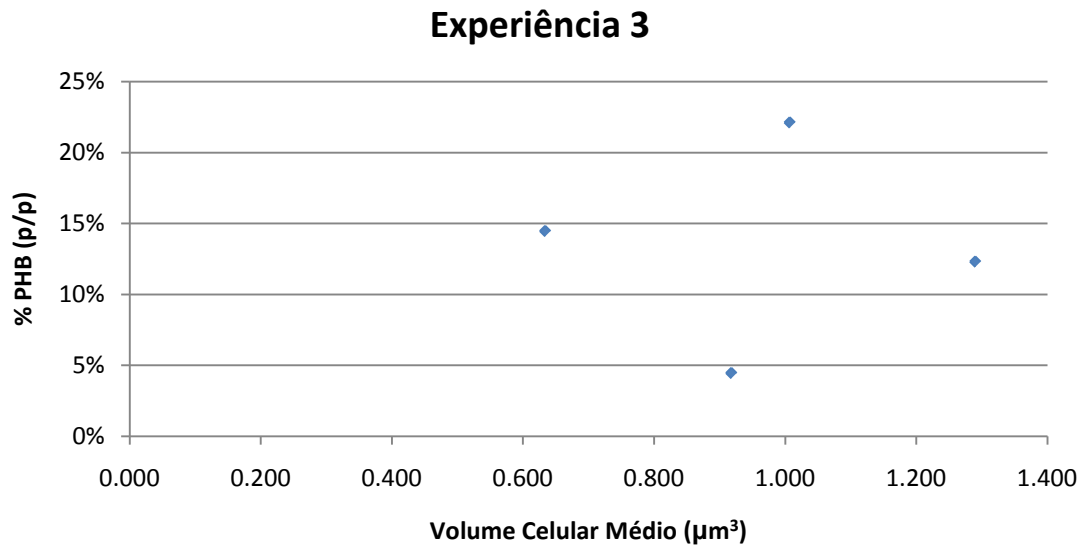


Figura 3.37 - Variação da % mássica de PHB em função do volume celular médio para a experiência 3.

## 4. Conclusões

Tendo em conta as amostras a analisar, determinou-se que a concentração final de *DAPI* de 10  $\mu\text{g/ml}$  é adequada e que a melhor maneira de fixar as amostras previamente à observação é com uma concentração final de 5% de formaldeído, com posterior conservação no congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Este método foi o único que permitiu a obtenção de imagens com qualidade suficiente para a aplicação do método de análise de imagem, não existindo qualquer aglomeração nas amostras e permitindo uma eficaz penetração dos corantes, problemas que existiram singularmente ou em conjunto em todos os outros métodos avaliados. Para além destes aspectos, este método é também o mais rápido a nível de execução.

Verificou-se que não existe uma relação linear ou logarítmica entre o número de diluições a fazer e  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  ou *CDW* válida para um largo espectro de valores. No entanto, os resultados obtidos permitiram estabelecer relações logarítmicas para alguns intervalos de valores e deixam antever que no futuro será possível chegar a essa calibração para uma gama alargada de valores e perceber se a calibração será válida para experiências independentes e diferentes. As relações estabelecidas neste trabalho permitiram estimar com sucesso as diluições necessárias para amostras com valores de  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  e *CDW* incluídos nas gamas de valores onde as relações são válidas e permitiram definir um intervalo para as diluições a fazer para as amostras fora da gama de validade das relações estabelecidas.

A determinação da concentração celular através do recurso a análise de imagem é já uma técnica bastante fundamentada. Apesar de se ter verificado que o *DAPI* não penetra nos locais onde existe PHB, foi possível aplicá-la com sucesso. Os resultados obtidos recorrendo a análise de imagem para a concentração celular mostraram-se coerentes com aquilo que se verificou com as outras grandezas que traduzem o andamento das experiências, nomeadamente a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  e *CDW*. Para além disso, o erro associado às medidas feitas por análise de imagem (o erro médio é inferior a 7 %) também indica que se pode aplicar este método para quantificar células provenientes de experiências de acumulação de PHB. Desta forma, o método seguido e a aplicação informática utilizada, o *software CellC*, parecem ser adequados para este tipo de aplicação. No que diz respeito à aplicação *CellC*, demonstrou ser eficiente no tratamento e análise das imagens obtidas, sendo, no entanto, sensível à correcta afinação dos parâmetros de separação de células agregadas e de remoção de objectos que constituem ruído. Ficou demonstrado que esta afinação deve ser efectuada com algum cuidado e atenção para cada *batch* de imagens a analisar, de forma a não obter resultados que não correspondam à realidade. O facto de o *DAPI* não penetrar nas zonas onde existe

biopolímero também afectou a capacidade da aplicação *CellC* em segmentar e contabilizar correctamente as células, embora a forma como os resultados obtidos por análise de imagem se relacionam com os dados de  $DO_{600nm}$  e *CDW* demonstre que a incorrecção não é significativa.

Os problemas que surgiram numa fase inicial e que afectam de forma determinante a viabilidade da análise de imagem, nomeadamente a existência de bolhas de ar nas membranas no momento da observação ao microscópio, a existência de zonas preferenciais de filtração devido a uma distribuição não homogénea do vácuo e a destruição das células durante a filtração, foram resolvidos com sucesso através do recurso à colocação de óleo de imersão entre a lamela e a membrana com as células da amostra, através da utilização de um filtro sobre o suporte do *kitasato* para homogeneizar o vácuo e através da diminuição do vácuo para um valor mínimo que permita a filtração das células, respectivamente.

No que diz respeito à determinação da concentração de PHB nas células os resultados obtidos permitem concluir que é possível quantificar a concentração volumétrica de PHB. Conseguiu-se desenvolver com sucesso um método que permite analisar para a mesma amostra as células e os grãos de polímero, através de *double-staining* com *DAPI* e Azul de Nilo, que consiste numa incubação da amostra com Azul de Nilo durante 10 minutos a 56 °C, e à adição posterior do *DAPI*. Os resultados obtidos, na forma de percentagem volumétrica, para as amostras disponíveis, mostraram, de uma maneira geral, um comportamento semelhante aos obtidos, na forma de percentagem mássica, através de cromatografia gasosa. O erro associado às medidas feitas por análise de imagem (erro médio de 2%) também indica que se pode aplicar este método para quantificar a concentração volumétrica de PHB. As imagens obtidas nesta fase do trabalho também poderão permitir no futuro uma análise qualitativa da distribuição da acumulação do biopolímero na população celular, o que pode ser mais uma forma de monitorizar e controlar as fermentações.

No entanto, ficou demonstrado que a viabilidade do método, aplicado quer para quantificar a concentração celular, quer a concentração volumétrica de biopolímero, está dependente da resistência das células ao stress a que são sujeitas desde a fixação das amostras até à sua observação ao microscópio, e que a resistência das células pode estar relacionada com a concentração de biopolímero, ou das condições da fermentação.

A caracterização das células, permitiu estabelecer relações entre o volume celular médio e os resultados da concentração celular e de *CDW*. Os comportamentos destas três grandezas foi coerente quando comparadas entre si para a generalidade das amostras observadas. Não

foi possível determinar qualquer relação entre a concentração de PHB e o volume médio celular, embora numa das experiências estudadas exista uma tendência para que a concentração mássica de PHB aumente conforme o volume celular médio aumenta. Esta parte do trabalho demonstra que a análise de imagem pode ser usada para monitorizar e caracterizar o crescimento celular e também a acumulação de PHB ao longo de uma fermentação.

Como conclusão geral, conseguiu-se cumprir os objectivos inicialmente propostos, pois desenvolveu-se, com sucesso, uma técnica de análise de imagem que permite a determinação das concentrações volumétrica de PHB e de células.



## 5. Perspectivas Futuras

Ao nível de futuros desenvolvimentos do que foi realizado neste trabalho, existe uma grande variedade de assuntos que podem ser investigados numa perspectiva de continuidade. Se para a determinação da concentração celular o trabalho futuro passa sobretudo por uma optimização do método tendo em conta o tipo de amostras que são analisadas e posterior verificação da reprodutibilidade de resultados, para a determinação da concentração de PHB existem mais aspectos a desenvolver. Neste caso particular os passos seguintes de desenvolvimento podem envolver não só a parte laboratorial, mas também podem ser feitos avanços ao nível do *software*. Desta forma, a nível laboratorial é necessário optimizar o método de forma a contornar os problemas de fragilidade das células encontrados para as amostras com maior conteúdo em polímero. Parte da solução para este problema pode também passar por alterações na maneira como se aborda o problema, nomeadamente pelo estudo da possibilidade de medir a concentração de polímero mesmo quando as células perdem a sua integridade. É ainda possível facilitar um pouco o trabalho para o utilizador da aplicação *CellC* através de diversas alterações no *software*. Assim, é de ponderar a integração da soma das imagens relativas ao polímero e ao restante conteúdo celular na aplicação, evitando um passo manual prévio. Também é aconselhável adaptar o conjunto de opções disponíveis e o próprio aspecto da interface tendo em conta a especificidade dos passos em causa neste trabalho. Seria assim interessante visualizar na interface as três imagens envolvidas no passo prévio de soma e integrar no código da aplicação as operações que se fazem, actualmente, após o processamento da imagem, para que os ficheiros que contêm os resultados mostrassem imediatamente o conteúdo em polímero da amostra em questão.

Olhando um pouco mais para a frente no tempo e aproveitando as possibilidades oferecidas pela análise de imagem em relação à caracterização morfológica das células, seria também interessante tentar relacionar as características morfológicas medidas com o acumulação de biopolímero ou até com velocidades de crescimento celular ou de consumo de nutrientes, de forma a efectuar uma caracterização do crescimento celular e da acumulação de biopolímero mais aprofundada. Existe também a possibilidade de fazer uma caracterização de uma população celular no que diz respeito à distribuição da acumulação de biopolímero nessa população, no entanto, isto implica desde logo o desenvolvimento de ferramentas informáticas próprias para o efeito, ou alterações profundas naquela que foi utilizada neste trabalho.

Será também natural a evolução destes métodos para a aplicação em culturas mistas, utilizando outros corantes ou técnicas que envolvam *FISH*, de forma a possibilitar a diferenciação de populações, e a caracterizá-las individualmente quer a nível morfológico, quer a nível de concentração celular específica.

## 6. Bibliografia

Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J. and Ram, S.J. (2004) 'Image Processing with ImageJ', *Biophotonics International*, Vol. 11, No. 7, pp. 36-42.

Ahn, W.S., Park, S.J. and Lee, S.Y. (2001) 'Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*', *Biotechnology Letters*, Vol. 23, No. 3, pp. 235-240.

Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995) 'Phylogenetic Identification and in-Situ Detection of Individual Microbial-Cells without Cultivation', *Microbiological Reviews*, Vol. 59, No. 1, pp. 143-169.

American Public Health Association., American Water Works Association. and Federation of Sewage and Industrial Wastes Associations. (1989) 'Standard methods for the examination of water and wastewater', American Public Health Association, Washington D.C.

Betscheider, D. and Jose, J. (2009) 'Nile blue A for staining *Escherichia coli* in flow cytometer experiments', *Analytical Biochemistry*, Vol. 384, No. 1, pp. 194-196.

Bjornsen, P.K. (1986) 'Automatic-Determination of Bacterioplankton Biomass by Image-Analysis', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 51, No. 6, pp. 1199-1204.

Blackburn, N., Hagstrom, A., Wikner, J., Cuadros-Hansson, R. and Bjornsen, P.K. (1998) 'Rapid determination of bacterial abundance, biovolume, morphology, and growth by neural network-based image analysis', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 9, pp. 3246-3255.

Bloem, J., Veninga, M. and Shepherd, J. (1995) 'Fully-Automatic Determination of Soil Bacterium Numbers, Cell Volumes, and Frequencies of Dividing Cells by Confocal Laser-Scanning Microscopy and Image-Analysis', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, No. 3, pp. 926-936.

Borin, A., Ferrao, M.F., Mello, C., Cordi, L., Pataca, L.C.M., Duran, N. and Poppi, R.J. (2007) 'Quantification of *Lactobacillus* in fermented milk by multivariate image analysis with least-squares support-vector machines', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 387, No. 3, pp. 1105-1112.

Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J. and Desjardins, R. (1999) 'LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water', *J Microbiol Methods*, Vol. 37, No. 1, pp. 77-86.

Bratbak, G. (1985) 'Bacterial Biovolume and Biomass Estimations', *Appl Environ Microbiol*, Vol. 49, No. 6, pp. 1488-1493.

Braunegg, G., Lefebvre, G. and Genser, K.F. (1998) 'Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects', *Journal of Biotechnology*, Vol. 65, No. 2-3, pp. 127-161.

Braunegg, G., Sonnleitner, B. and Lafferty, R.M. (1978) 'Rapid Gas-Chromatographic Method for Determination of Poly-Beta-Hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass', *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 6, No. 1, pp. 29-37.

Celis, J.E. (2006) *Cell biology : a laboratory handbook*. Elsevier Academic, Amsterdam ; Boston.

Comeau, Y., Hall, K.J. and Oldham, W.K. (1988) 'Determination of Poly-beta-Hydroxybutyrate and Poly-beta-Hydroxyvalerate in Activated Sludge by Gas-Liquid Chromatography', *Appl Environ Microbiol*, Vol. 54, No. 9, pp. 2325-2327.

da Motta, M., Pons, M.N., Roche, N. and Vivier, H. (2001) 'Characterisation of activated sludge by automated image analysis', *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 9, No. 3, pp. 165-173.

Daims, H., Lucker, S. and Wagner, M. (2006) 'daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research', *Environmental Microbiology*, Vol. 8, No. 2, pp. 200-213.

Daims, H., Ramsing, N.B., Schleifer, K.H. and Wagner, M. (2001) 'Cultivation-independent, semiautomatic determination of absolute bacterial cell numbers in environmental samples by fluorescence in situ hybridization', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 12, pp. 5810-5818.

Daims, H. and Wagner, M. (2007) 'Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis', *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 75, No. 2, pp. 237-248.

Degelau, A., Scheper, T., Bailey, J.E. and Guske, C. (1995) 'Fluorometric Measurement of Poly-Beta Hydroxybutyrate in *Alcaligenes-Eutrophus* by Flow-Cytometry and Spectrofluorometry', *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 42, No. 5, pp. 653-657.

DeLong, E.F., Wickham, G.S. and Pace, N.R. (1989) 'Phylogenetic Stains - Ribosomal Rna-Based Probes for the Identification of Single Cells', *Science*, Vol. 243, No. 4896, pp. 1360-1363.

Fonseca, G.G. and Antonio, R.V. (2006) 'Poly-(3-hydroxybutyrate) production by recombinant *Escherichia coli* using cheap renewable carbon sources and a supplement', *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 49, pp. 181-187.

Fonseca, G.G., Fonseca, G.G., de Arruda-Caulkins, J.C. and Antonio, R.V. (2008) 'Production and characterization of poly-(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* grown on cheap renewable carbon substrates', *Waste Management & Research*, Vol. 26, No. 6, pp. 546-552.

Gonzalez, R.C., Woods, R.E. and Eddins, S.L. (2004) *Digital Image processing using MATLAB*. Pearson/Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Gorenflo, V., Steinbuchel, A., Marose, S., Rieseberg, M. and Scheper, T. (1999) 'Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining', *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 51, No. 6, pp. 765-772.

Graça, M.A.S., Bärlocher, F. and Gessner, M.O. (2005) *Methods to study litter decomposition : a practical guide*. Springer, Dordrecht ; New York.

Harris, J.R., Graham, J.M. and Rickwood, D. (2005) *Cell biology protocols*. John Wiley & Sons Ltd, England.

Hermawan, S. and Jendrossek, D. (2007) 'Microscopical investigation of poly(3-hydroxybutyrate) granule formation in *Azotobacter vinelandii*', *Fems Microbiology Letters*, Vol. 266, No. 1, pp. 60-64.

Hermida, M., Taboada, M., Menendez, S. and Rodriguez-Otero, J.L. (2000) 'Semi-automated direct epifluorescent filter technique for total bacterial count in raw milk', *Journal of Aoac International*, Vol. 83, No. 6, pp. 1345-1348.

Hobbie, J.E., Daley, R.J. and Jasper, S. (1977) 'Use of Nuclepore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 33, No. 5, pp. 1225-1228.

Howard, D.H. (1956) 'The preservation of bacteria by freezing in glycerol broth', *J Bacteriol*, Vol. 71, No. 5, p. 625.

Hug, T., Gujer, W. and Siegrist, H. (2005) 'Rapid quantification of bacteria in activated sludge using fluorescence in situ hybridization and epifluorescence microscopy', *Water Research*, Vol. 39, No. 16, pp. 3837-3848.

Jähne, B. (2005) *Digital image processing*. Springer, Berlin ; New York.

Kacmar, J., Carlson, R., Balogh, S.J. and Srienc, F. (2006) 'Staining and quantification of poly-3-hydroxybutyrate in *Saccharomyces cerevisiae* and *Cupriavidus necator* cell populations using automated flow cytometry', *Cytometry Part A*, Vol. 69A, No. 1, pp. 27-35.

Kepner, R.L. and Pratt, J.R. (1994) 'Use of Fluorochromes for Direct Enumeration of Total Bacteria in Environmental-Samples - Past and Present', *Microbiological Reviews*, Vol. 58, No. 4, pp. 603-615.

Kirchman, D., Sigda, J., Kapuscinski, R. and Mitchell, R. (1982) 'Statistical-Analysis of the Direct Count Method for Enumerating Bacteria', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 44, No. 2, pp. 376-382.

Lee, S.Y., Middelberg, A.P.J. and Lee, Y.K. (1997) 'Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*', *Biotechnology Letters*, Vol. 19, No. 10, pp. 1033-1035.

Lemos, P.C., Serafim, L.S. and Reis, M.A. (2006) 'Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding', *Journal of Biotechnology*, Vol. 122, No. 2, pp. 226-38.

Lunau, M., Lemke, A., Walther, K., Martens-Habbena, W. and Simon, M. (2005) 'An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy', *Environmental Microbiology*, Vol. 7, No. 7, pp. 961-968.

Madrid, R.E. and Felice, C.J. (2005) 'Microbial biomass estimation', *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 25, No. 3, pp. 97-112.

Mason, W.T. (1999) *Fluorescent and luminescent probes for biological activity : a practical guide to technology for quantitative real-time analysis*. Academic Press, San Diego, Calif.

Mesa, M.M., Macias, M., Cantero, D. and Barja, F. (2003) 'Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation', *Journal of Fluorescence*, Vol. 13, No. 3, pp. 261-265.

Nikel, P.I., de Almeida, A., Melillo, E.C., Galvagno, M.A. and Pettinari, M.J. (2006) 'New recombinant Escherichia coli strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 6, pp. 3949-3954.

Onda, S., Hiraishi, A., Matsuo, Y. and Takii, S. (2002) 'Polyphasic approaches to the identification of predominant polyphosphate-accumulating organisms in a laboratory-scale anaerobic/aerobic activated sludge system', *Journal of General and Applied Microbiology*, Vol. 48, No. 1, pp. 43-54.

Oshiki, M., Onuki, M., Satoh, H. and Mino, T. (2008) 'PHA-accumulating microorganisms in full-scale wastewater treatment plants', *Water Science and Technology*, Vol. 58, No. 1, pp. 13-20.

Ostle, A.G. and Holt, J.G. (1982) 'Nile Blue-a as a Fluorescent Stain for Poly-Beta-Hydroxybutyrate', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 44, No. 1, pp. 238-241.

Otsu, N. (1979) 'A threshold selection method from gray-level histograms', *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, Vol. 9, No. 1, pp. 62-66.

Pais, J. (Tese em Curso) 'Valorisation of Cheese Whey for the production of biomaterials ': *Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa*.

Pandey, A. (2004) *Concise encyclopedia of bioresource technology*. Food Products Press, New York.

Pandolfi, D., Pons, M.N. and da Motta, M. (2007) 'Characterization of PHB storage in activated sludge extended filamentous bacteria by automated colour image analysis', *Biotechnology Letters*, Vol. 29, No. 8, pp. 1263-1269.

Park, S.J., Park, J.P. and Lee, S.Y. (2002) 'Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* in a pilot-scale fermenter', *Biotechnology Letters*, Vol. 24, No. 3, pp. 185-189.

Pascaud, A., Amellal, S., Soulas, M.L. and Soulas, G. (2009) 'A fluorescence-based assay for measuring the viable cell concentration of mixed microbial communities in soil', *J Microbiol Methods*, Vol. 76, No. 1, pp. 81-7.

Pettipher, G.L. and Rodrigues, U.M. (1982) 'Rapid Enumeration of Microorganisms in Foods by the Direct Epifluorescent Filter Technique', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 44, No. 4, pp. 809-813.

Pisco, A.R., Bengtsson, S., Werker, A., Reis, M.A. and Lemos, P.C. (2009) 'Community structure evolution and enrichment of glycogen-accumulating organisms producing polyhydroxyalkanoates from fermented molasses', *Appl Environ Microbiol*, Vol. 75, No. 14, pp. 4676-86.

Platt, D.K. and Rapra Technology Limited. (2006) *Biodegradable polymers : market report*. Rapra Technology, Shrewsbury, Shropshire, U.K.

Pons, M.N., Drouin, J.F., Louvel, L., Vanhoutte, B., Vivier, H. and Germain, P. (1998) 'Physiological investigations by image analysis', *Journal of Biotechnology*, Vol. 65, No. 1, pp. 3-14.

Porter, K.G. and Feig, Y.S. (1980) 'The Use of Dapi for Identifying and Counting Aquatic Microflora', *Limnology and Oceanography*, Vol. 25, No. 5, pp. 943-948.

Rapposch, S., Zangerl, P. and Ginzinger, W. (2000) 'Influence of fluorescence of bacteria stained with acridine orange on the enumeration of microorganisms in raw milk', *Journal of Dairy Science*, Vol. 83, No. 12, pp. 2753-2758.

Ross, J., Boon, P.I., Sharma, R. and Beckett, R. (1996) 'Variations in the fluorescence intensity of intact DAPI-stained bacteria and their implications for rapid bacterial quantification', *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 22, No. 4, pp. 283-287.

Russ, J.C. (2007) *The image processing handbook*. CRC/Taylor and Francis, Boca Raton.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2006) *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Satoh, H. (1991) 'Biochemical mechanisms of the anaerobic substrate uptake by enhanced biological phosphorous removal activated sludges.': *Department of Urban and Environmental Engineering*, University of Tokyo, Tokyo.

Selinummi, J., Seppala, J., Yli-Harja, O. and Puhakka, J.A. (2005) 'Software for quantification of labeled bacteria from digital microscope images by automated image analysis', *Biotechniques*, Vol. 39, No. 6, pp. 859-863.

Serafim, L.S., Lemos, P.C., Torres, C., Reis, M.A. and Ramos, A.M. (2008) 'The influence of process parameters on the characteristics of polyhydroxyalkanoates produced by mixed cultures', *Macromol Biosci*, Vol. 8, No. 4, pp. 355-66.

Sieracki, M.E., Johnson, P.W. and Sieburth, J.M. (1985) 'Detection, Enumeration, and Sizing of Planktonic Bacteria by Image-Analyzed Epifluorescence Microscopy', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 49, No. 4, pp. 799-810.

Sieracki, M.E., Reichenbach, S.E. and Webb, K.L. (1989a) 'Evaluation of Automated Threshold Selection Methods for Accurately Sizing Microscopic Fluorescent Cells by Image-Analysis', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 55, No. 11, pp. 2762-2772.

Sieracki, M.E., Viles, C.L. and Webb, K.L. (1989b) 'Algorithm to Estimate Cell Biovolume Using Image Analyzed Microscopy', *Cytometry*, Vol. 10, No. 5, pp. 551-557.

Solera, R., Romero, L.I. and Sales, D. (2001) 'Determination of the microbial population in thermophilic anaerobic reactor: Comparative analysis by different counting methods', *Anaerobe*, Vol. 7, No. 2, pp. 79-86.

Tyo, K.E., Zhou, H. and Stephanopoulos, G.N. (2006) 'High-throughput screen for poly-3-hydroxybutyrate in Escherichia coli and Synechocystis sp strain PCC6803', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 5, pp. 3412-3417.

Vecht-Lifshitz, S.E. and Ison, A.P. (1992) 'Biotechnological applications of image analysis: present and future prospects.', *Journal of Biotechnology*, Vol. 23, No. 1, pp. 1-18.

Wendlandt, K.D., Geyer, W., Mirschel, G. and Hemidi, F.A. (2005) 'Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods', *Journal of Biotechnology*, Vol. 117, No. 1, pp. 119-129.

Wong, H.H. and Lee, S.Y. (1998) 'Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant Escherichia coli', *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 50, No. 1, pp. 30-33.

## Anexos

**Tabela A.1- Dados da experiência 1 (Pais, Tese em Curso).**

Tempo (h)	DO <sub>600nm</sub>	CDW (g/L)	[PHB] (g/l)	%PHB (p/p)
0.00	0.14	2.80		
0.00	0.16	3.03	0.23	7.57
1.87	0.26	4.50		
2.88	0.33	5.78		
3.88	0.38	5.82	0.14	2.33
5.13	0.41	6.38	0.17	2.60
5.78	0.42	5.75		
5.85	0.62	5.08		
7.13	1.21	6.19		
7.80	1.74	5.87		
8.43	1.96	5.62	0.81	14.45
9.00	2.10	5.64		
10.00	2.22	6.33	0.82	13.00
11.15	2.62	6.01		
12.22	3.26	5.87		
13.07	3.78	5.78	0.82	14.27
14.17	5.10	6.29		
14.67	7.00	6.49	1.23	18.90
15.10	8.25	6.33		
15.65	9.25	6.30	1.08	17.12
16.75	11.35	7.85		
17.53	16.90	8.93	1.61	18.00
18.13	20.60	9.93	1.15	11.61
18.62	37.40	13.35	1.80	13.44
20.63	54.40	20.37	2.95	14.48
21.63	83.50	22.38	3.12	13.94
22.63	82.00	19.65	2.40	12.22
23.67	77.50	19.36	3.17	16.36
25.02	73.50	27.17	3.69	13.59
26.13	75.00	23.89	2.73	11.41
27.13	75.00	25.21	3.43	13.62
27.93	72.50	27.92	3.95	14.16
28.60	72.00	27.54		
30.95	62.00	34.07		
32.63	76.00	49.29	10.55	21.40
33.22	85.00	49.59	12.05	24.30
33.65	84.50	59.48		
35.08	98.00	69.21	15.36	22.20
36.70	113.50	65.87	17.40	26.42
38.77	107.50	62.04	12.98	20.92
39.97	90.50	75.93	19.23	25.32
41.33	95.50	65.63	13.95	21.26
44.77	113.00	65.17	13.25	20.33
45.92	131.00	54.89	11.70	21.32
46.92	127.50	79.77	18.68	23.42
47.88	124.00	66.05	15.22	23.04

**Tabela A.2 - Dados da experiência 2 (Pais, Tese em Curso).**

<b>tempo (h)</b>	<b>DO<sub>600nm</sub></b>	<b>CDW (g/l)</b>	<b>[PHB] (g/l) (cromatografia gasosa)</b>	<b>% PHB (p/p)</b>
0.00	0.56	2.95	0.69	23.43
1.57	0.75	2.62	0.50	19.00
3.35	0.98	4.37	0.54	12.32
4.87	1.54	5.50	0.98	17.72
6.50	2.86	5.28	0.89	16.94
8.13	4.10	4.63	0.72	15.62
9.77	5.55	5.51	0.95	17.21
11.40	7.35	6.04	0.96	15.96
13.03	9.25	6.21	1.02	16.44
14.67	15.50	7.89	1.58	20.04
15.92	18.30	8.31	1.75	21.07
16.92	22.40	12.02	2.18	18.09
18.17	23.70	13.45	2.92	21.74
19.17	28.10	13.82	3.31	23.98
20.67	41.20	15.65	4.91	31.38
21.73	45.20	16.80	4.81	28.63
23.18	56.60	19.15	5.24	27.36
23.95	68.00	20.70	5.95	28.73
24.37	74.50	26.75	7.31	27.32
26.67	80.00	23.82	5.78	24.29
27.92	55.00	39.69	9.21	23.22
30.22	76.00	46.79	11.34	24.24
31.47	70.50	44.58	10.76	24.15
33.52	111.00	37.52	6.90	18.38
37.02	115.00	45.26	9.73	21.50
40.98	139.00	56.51	12.05	21.32
41.37	121.00	54.11	11.64	21.51
44.40	120.00	47.98	8.40	17.51
49.68	132.50	49.45	9.72	19.67
51.32	110.50	80.20	19.65	24.50
51.98	108.00	74.31	17.79	23.94
53.97	119.00	70.19	15.29	21.78
54.47	127.00	111.75	28.53	25.53
55.17	113.00	103.90	21.49	20.68
55.38	117.50	120.69	33.85	28.05
55.83	118.00	117.09		
56.22	106.00	119.49		
56.40	103.00	132.07	32.28	24.44
56.60	106.00	106.04	23.17	21.85
56.75	107.00	119.21	30.05	25.21
57.58	103.00	130.23	32.00	24.58
57.65	95.50	105.69	24.84	23.51
57.85	92.00	113.90	25.24	22.15
58.47	92.50	131.31	29.02	22.10
58.68	92.50	130.18	29.26	22.48
59.00	69.50	122.87	25.62	20.85
59.78	84.50	119.15	27.01	22.67
60.55	88.00	136.51	28.52	20.89
61.70	79.50	107.31	23.80	22.17

**Tabela A.3 - Dados da experiência 3 (Pais, Tese em Curso).**

Tempo (h)	DO <sub>600nm</sub>	CDW (g/l)	[PHB] (g/l) (cromatografia gasosa)	% PHB (p/p)
0.00	0.15			
0.00	0.28	2.90	0.01	0.25
1.83	0.54			
3.48	0.95			
4.57	3.17	3.89	0.26	6.63
5.45	4.10	4.20	0.19	4.45
8.83	11.35	6.68	0.59	8.81
10.45	18.00			
11.45	21.40	10.11	1.21	11.95
12.95	29.00	12.70	1.47	11.57
14.45	29.40			
15.95	30.60			
19.50	32.40	15.31	2.22	14.47
20.87	20.00	9.58	1.34	13.98
21.95	18.20	8.98	1.41	15.64
22.62	19.60	9.47	1.56	16.46
23.57	29.00	12.58	2.78	22.13
24.02	29.20	15.63	3.26	20.87
24.12	31.20	14.76	3.12	21.11
24.43	31.20	18.11	4.34	23.93
25.02	34.20	17.59	4.42	25.14
25.10	30.80			
25.32	29.60			
25.40	30.60	19.96	4.59	23.00
25.92	29.60	18.20	2.90	15.96
26.25	31.60	21.95	4.23	19.28
26.82	29.60	19.42	3.71	19.10
26.90	33.00	24.27	4.39	18.09
27.28	35.00	23.78	5.05	21.24
27.35	30.60			
29.95	55.20	36.99	5.97	16.15
31.45	97.50	61.74	2.55	4.14
31.95	104.50	65.68	6.83	10.40
33.45	136.50	61.10	6.38	10.44
34.53	151.00	92.55	7.21	7.79
34.62	206.00			
35.33	216.00	117.89	11.84	10.05
35.58	215.00			
36.45	226.00	117.57	12.31	10.47
37.02	206.00	124.46	5.28	4.24
37.08	171.00	117.31	4.72	4.03
38.17	205.00	105.49	13.41	12.71
38.42	205.00			
39.78	204.00	123.40	14.09	11.41
41.97	193.00			
42.08	194.00	129.98	10.91	8.39
43.67	201.00	122.37	15.06	12.31

**Tabela A.4 – Dados da experiência 4 (Pais, Tese em Curso).**

<b>Amostra</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>% PHB (p/p)</b>
A0	0.08	-
A1	3.00	-
A2	6.17	-
A3	19.00	-
A4	22.00	-
A5	23.83	-
A6	27.00	-
A7	42.25	-
A8	46.00	-
A9	72.00	-
		-
B-1	0.00	-
B0	0.08	-
B1	3.00	-
B2	6.75	-
B3	18.33	-
B4	22.00	-
B5	48.00	-
		-
C0	0.17	-
C1	11.25	18.06
C2	15.83	18.68
C3	18.50	22.28
C4	19.08	25.36
C5	40.83	28.58
C6	84.58	32.26
C7	108.33	30.07
		-
D0	0.17	-
D1	11.33	18.29
D2	15.83	27.48
D3	18.50	27.94
D4	19.08	26.20
D5	40.83	31.33
D6	84.58	35.89
D7	108.33	39.69

**Tabela A.5 - Dados da experiência 5 (Pais, Tese em Curso).**

Tempo (h)	CDW (g/l)	[PHB] g/l	%PHB	[lactose] (g/l)
0.00	-	-	-	30.00
0.28	0.60	0.13	20.61	29.29
6.57	2.00	0.66	32.41	23.94
9.38	3.90	1.46	36.94	63.50
11.38	5.30	-	-	103.56
13.38	6.60	3.25	33.90	157.97
15.38	8.90	3.82	32.78	165.96
17.63	13.30	13.24	35.56	152.23
20.63	10.00	9.09	33.04	150.98
30.83	11.20	11.98	43.18	127.04
33.38	5.00	8.75	50.13	154.45
35.38	5.60	7.59	49.71	117.50
37.38	7.40	6.33	37.82	170.38
39.38	9.70	8.43	44.29	156.89
41.72	8.70	-	-	19.76
45.72	7.30	9.71	41.04	187.07
54.72	14.50	10.33	33.41	177.56
57.38	10.50	10.69	41.12	182.57
59.38	14.10	10.87	36.87	166.06
61.72	16.50	11.18	34.75	155.88
64.72	16.20	10.68	33.19	11.21
66.72	12.60	9.97	35.32	129.06
91.13	16.80	13.03	44.46	137.72
114.38	14.20	15.89	59.92	173.85
130.72	13.70	16.21	63.02	270.28