

## LEITURA DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE ÓLEOS ESSENCIAIS PELO MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO E INDICADOR RESAZURINA UTILIZANDO O SOFTWARE IMAGEJ

Larissa Franciscatti Hoffmann (PIC/UEM), Adryelen Cassiano Martins, Milene Ribeiro da Silva, Cristiane Mengue Feniman Moritz (Orientadora), e-mail: crisfeniman@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Tecnologia / Umuarama, PR.

### Ciências Biológicas III / Microbiologia / Bacterologia

**Palavras-chave:** Microdiluição, rezasurina, ImageJ.

#### Resumo:

Este estudo teve como objetivo avaliar a diferença nas leituras das microplacas por dois métodos distintos. Os resultados foram expressos por imagens originais após a incubação com o indicador rezasurina e imagens tratadas pelo software ImageJ. O procedimento estabelecido para tais leituras mostrou-se confiável.

#### Introdução

Os métodos colorimétricos para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) são considerados rápidos e de baixo custo (MARTIN *et al.*, 2003).

O método de microdiluição proposto por Mann e Markham (1998) para a determinação a CIM de óleos essenciais baseou-se na comparação da leitura visual e fotométrica das microplacas e demonstrou que os resultados da microdiluição podem ser avaliados sem instrumentação.

No entanto, a leitura da microplaca com o indicador rezasurina passa a ser subjetiva e conforme a percepção do analista. Em determinadas situações, conforme o óleo essencial que está sendo testado, a diferenciação de cor entre o azul e o rosa fica comprometida e causa incerteza na leitura para considerar crescimento microbiano positivo ou negativo.

Desse modo, o objetivo do trabalho foi estabelecer um procedimento de leitura da coloração utilizando o software ImageJ para microplacas utilizadas na determinação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais pelo método de microdiluição e indicador rezasurina.

## Materiais e métodos

Foram utilizadas fotografias de microplacas de testes de atividade antimicrobiana de óleos essenciais desenvolvidos pelo grupo de pesquisa. Foram adicionados 50 µL de solução aquosa de resazurina a 0,01% em cada um dos poços após a incubação das mesmas para a ação antimicrobiana dos óleos essenciais. Após a adição do indicador, as microplacas permaneceram *overnight* a 7 °C, quando então foram fotografadas.

As imagens obtidas foram tratadas no software ImageJ (disponível em <https://imagej.nih.gov/ij/>) para obter a diferenciação dos poços positivos e negativos quanto ao crescimento microbiano.

O software foi executado e na opção “File” seguida de “Open”. Abriu-se a imagem para análise. Com a imagem previamente aberta, na janela Edit, escolheu-se a opção Invert (Ctrl + Shift + I), que gerou a imagem a ser comparada com as fotografias originais.

## Resultados e Discussão

Visando a possibilidade da utilização de uma técnica mais precisa para a realização da leitura CIM de óleos essenciais pelo método do indicador resazurina, utilizou-se o software ImageJ para a realização de uma leitura colorimétrica por meio da inversão de cores, para fins de comparação da leitura dos resultados pelas fotografias originais. Na Figura 1A observa-se a imagem de uma microplaca tratada pelo método indicador resazurina e na Figura 1B, a imagem analisada pelo software.

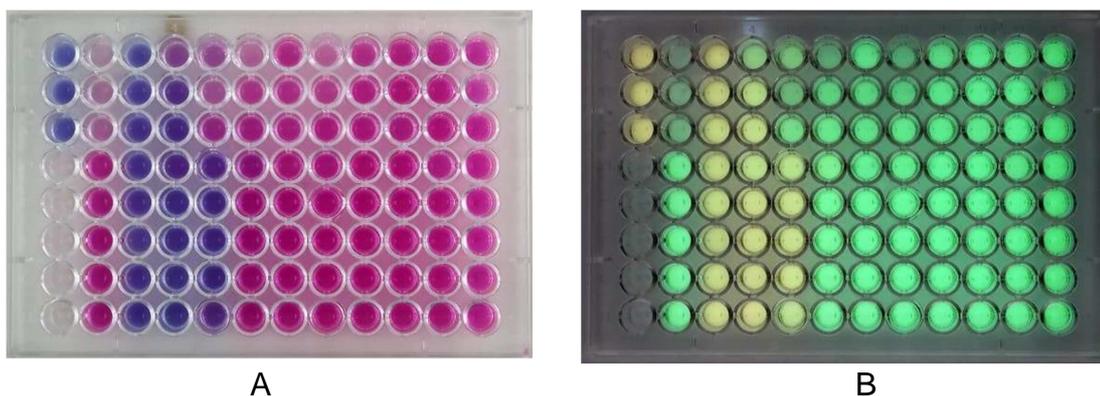


Figura 1 – Microplaca do método de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de óleos essenciais. (A): imagem original da microplaca após a incubação com o indicador resazurina. (B): imagem tratada pelo Software ImageJ.

A primeira coluna de poços da Figura 1A teve como referência os poços de controle negativo, em que não foi adicionada a cultura microbiana. A segunda coluna de poços da Figura 1A teve-se como referência os poços de

controle positivo, consistindo apenas as culturas em meio de cultura (ausência de antimicrobiano).

Para os poços de coloração rosa entendeu-se que houve redução do indicador com o meio de cultura reduzido em decorrência do metabolismo microbiano, ou seja, que houve inibição da cultura (resultado positivo). Nos poços de coloração azul houve inibição microbiana (resultado negativo).

Nas colunas 4 e 5, linha 1, observou-se que as cores apresentadas não foram semelhantes as cores tomadas como padrão positivo ou negativo, o que gerou dúvida e não se pode afirmar se houve ou não inibição do crescimento microbiano. Observando a Figura 1B, foi possível observar com clareza o resultado dos poços citados anteriormente, sendo que para ambos os casos não houve inibição do crescimento microbiano. A inversão das cores disponível no software permitiu uma maior visibilidade dos resultados, uma vez que o comando inverte todas as cores e valores de brilho dos pixels da camada ativa da imagem, tornando áreas claras em áreas escuras. Os resultados da comparação foram expostos similarmente como mostra a Figura 2, na qual os símbolos (+), (-) e (+/-) representam se houve crescimento microbiano, se não houve crescimento microbiano e incerteza do resultado, respectivamente.

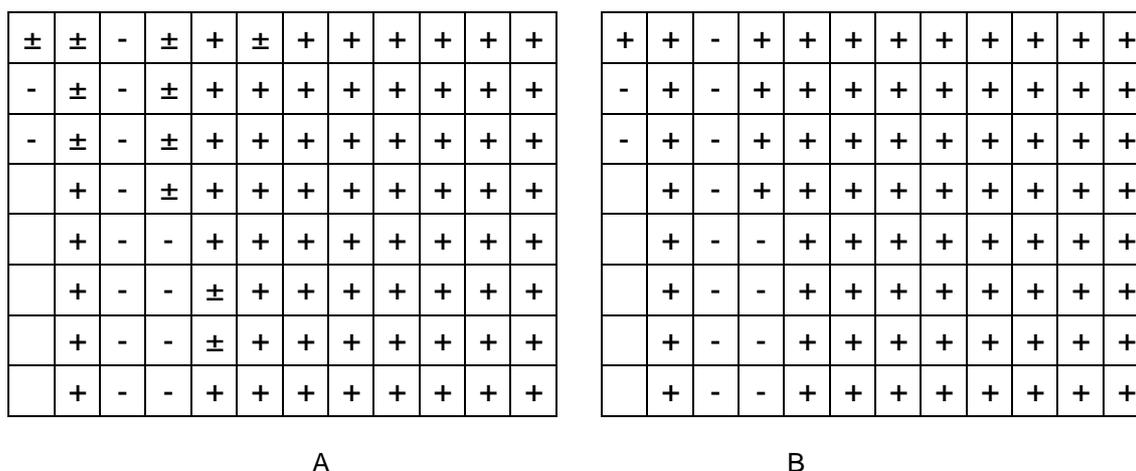


Figura 2 – Representação manual dos resultados obtidos na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de óleos essenciais. (A): analisando imagem original da microplaca após a incubação com o indicador resazurina. (B): analisando a imagem tratada pelo Software ImageJ.

A resazurina é um indicador de óxido-redução que foi extensivamente utilizada na investigação da qualidade do leite. É um indicador químico, que durante a sua redução há alteração de cor. No leite e em solução aquosa, a resazurina é azul e se reduz para resorufina, de coloração rosa. A resorufina pode ser reduzida ainda à hidrorresorufina, um composto incolor. A reação para resorufina é irreversível, enquanto que a redução para hidrorresorufina é reversível (ERB; EHLERS, 1950). O que explica que alguns poços do controle positivo (segunda coluna da Figura 1A) tenham ficado incolores.

A resazurina, também referenciada como Alamar Blue, é azul e não fluorescente. Quando reduzida pela atividade celular, provavelmente pelo consumo de oxigênio no metabolismo, passa a ter coloração rosa fluorescente (O'BRIEN, 2000). Para a detecção de *Mycobacterium tuberculosis* o método em placa por microdiluição proposto por Palomino *et al.* (2002) utilizando a resazurina foi denominado como REMA (Resazurin Microtiter Assay).

O baixo custo do método de microdiluição com leitura utilizando o indicador resazurina facilita o desenvolvimento de estudos com antimicrobianos, justamente por não necessitar de instrumentação fotométrica para a leitura. No entanto, a subjetividade na leitura dos diversos tons entre o azul e o rosa pode ser um fator limitante, quando não há parâmetros de coloração para antimicrobianos ainda não estabelecidos. Dessa forma, a utilização de um tratamento de imagem, favorecido pela utilização da resazurina que se reduz a um composto fluorescente para os resultados positivos, permite aplicar esse método simplificado com maior segurança e confiabilidade nos resultados a serem gerados.

## Conclusões

Para a leitura da CIM pelo método de microdiluição e utilizando o indicador resazurina, a análise das imagens das microplacas tratadas pelo Software ImageJ é uma técnica precisa e que pode oferecer confiabilidade para os resultados, eliminando a subjetividade.

## Referências

- ERB, R. E.; EHLERS, M. H. Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen capacity. **Journal of Dairy Science**, v. 33, n. 12, p. 853-864, 1950.
- MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 538-544, 1998.
- MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J. C. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3616–3619, 2003.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.
- PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M. GUERRA, J. SWINGS, J. PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.