PROTOCOLO PARA PURIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE BACTÉRIAS DE INTERESSE NO CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS PRAGA DA SOJA

Maria Eduarda Cimi[1]; Rodrigo Marinsek Sales[2]; Caroline Lessa[1]; Maria Sueli Soares Felipe[2]; Getulio Pereira de Oliveira Junior[2]

[1]Biomedicina – Universidade Católica de Brasília;

[2]Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília.

E-mail: maria.cimi@ucb.br; rodrigo.sales@a.ucb.br; caroline.lessa@a.ucb.br; msueli@p.ucb.br; getulio.junior@a.ucb.br

RESUMO

Para mitigar os danos do percevejo-marrom (*Euschistus heros*) na soja, este estudo avaliou um protocolo de isolamento e purificação de vesículas extracelulares bacterianas (bEVs) de *Chromobacterium subtsugae* e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Sobrenadantes de cultivos em biorreator foram submetidos a clarificação, ultrafiltração e cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), sendo caracterizados por TRPS, nanocitometria, microscopia eletrônica de transmissão (MET), SDS-PAGE e proteômica *label-free*. A SEC promoveu a separação efetiva das bEVs em relação às proteínas solúveis. As bEVs obtidas exibiram diâmetros médios similares (~132 nm e ~139 nm) e altas concentrações (~$2{,}8 \times 10^{12}$ partículas/mL). Nanocitometria e MET confirmaram a integridade membranar, morfologia típica e estabilidade das partículas. As análises por SDS-PAGE e proteômica comprovaram perfis moleculares distintos entre as frações. O protocolo multinível mostrou-se eficaz, reprodutível e robusto, fornecendo uma base promissora para o controle biológico de *E. heros*.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares bacterianas; Bioinseticida; *Chromobacterium subtsugae*; *Bacillus thuringiensis*:

INTRODUÇÃO

A expansão agrícola e a busca por práticas sustentáveis têm impulsionado novas estratégias para o manejo de insetos-praga. Na cultura da soja (*Glycine max* L.), o percevejo-marrom, *Euschistus heros* (Fabricius), destaca-se pelos danos às estruturas reprodutivas e à qualidade das sementes (Cimi et al., 2026). Nesse contexto, o uso de microrganismos e seus metabólitos surge como uma alternativa promissora aos defensivos químicos convencionais.

Entre os agentes biocontroladores, *Chromobacterium subtsugae* destaca-se pelo potencial entomopatogênico e toxicidade oral contra diferentes pragas (Martin *et al.*, 2007). Paralelamente, *Bacillus thuringiensis* é reconhecida pela produção de proteínas inseticidas, demonstrando-se que toxinas como a Vip3Aa podem ser secretadas via vesículas de membrana (Zhang *et al.*, 2022). As vesículas extracelulares bacterianas (bEVs) atuam, assim, como sistemas naturais de concentração e transporte de biomoléculas bioativas (Cimi et al., 2026).

Apesar desse potencial, a obtenção de bEVs enfrenta gargalos metodológicos, visto que diferentes estratégias de isolamento alteram a morfologia, o tamanho, a composição proteica e a coextração de contaminantes (Veerman et al., 2021). A ausência de métodos padronizados compromete a reprodutibilidade entre estudos (Witwer et al., 2013), destacando-se a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) como uma abordagem eficaz para separar vesículas das proteínas solúveis do meio (Veerman et al., 2021).

Embora bEVs de *C. subtsugae* e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* tenham demonstrado atividade biológica contra ninfas de *E. heros* (Cimi et al., 2026), a padronização de um protocolo de purificação robusto permanece indispensável. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi aplicar e avaliar um protocolo de isolamento e purificação de vesículas extracelulares produzidas por *Chromobacterium subtsugae* e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, visando à obtenção de preparações adequadas para sua caracterização e para futuras investigações de seu potencial no controle biológico de *Euschistus heros*

OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo foi aplicar e avaliar um protocolo para o isolamento e purificação de vesículas extracelulares produzidas por *Chromobacterium subtsugae* e *Bacillus thuringiensis*, visando à obtenção de preparações adequadas para sua caracterização e para futuras investigações de seu potencial no controle biológico de *Euschistus heros*.

MÉTODO

Delineamento e condições de cultivo

Trata-se de um estudo experimental destinado à obtenção e caracterização de vesículas extracelulares bacterianas (bEVs) produzidas por *Chromobacterium subtsugae* e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. As cepas, mantidas a −80 °C em glicerol a 16% (v/v), tiveram sua pureza confirmada em ágar Triptona de Soja (TSA). Culturas-semente foram inoculadas em biorreatores de aço inoxidável (volume útil de 5 a 50 L) sob aeração, agitação, temperatura, pH e oxigênio dissolvido controlados até a fase estacionária, totalizando quatro fermentações independentes por espécie (*C. subtsugae* cultivada a 28 °C com razão C/N de 15:1; *B. thuringiensis* a 30 °C com C/N de 8:1).

Isolamento e purificação das bEVs

As bEVs foram obtidas dos sobrenadantes por centrifugação diferencial (300 × *g*, 10 min; 2 000 × *g*, 20 min; 7 500 × *g*, 30 min), filtração em membrana de 0,22 µm e concentração por ultrafiltração (MWCO 3 kDa). As amostras foram purificadas por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) em colunas *qEVoriginal 35 nm* (Izon Science) equilibradas com dPBS. Coletaram-se a fração de vazio (2,5 mL), a fração enriquecida em bEVs (2,0 mL) e a fração de proteínas solúveis (6,0 mL), com descarte intermediário de 1,5 mL. A fração de bEVs foi re-concentrada a 100 µL por ultrafiltração (MWCO 100 kDa) e armazenada a 4 °C. As vesículas de *C. subtsugae* foram classificadas como vesículas de membrana externa (OMVs) e as de *B. thuringiensis* como vesículas de membrana citoplasmática (CMVs), utilizando-se "bEVs" como termo abrangente.

Determinação do tamanho e concentração das bEVs

A concentração e a distribuição de tamanho foram determinadas por *tunable resistive pulse sensing* (TRPS; qNano com nanoporo NP150, calibração com esferas CPC200 e registro mínimo de 500 eventos válidos/amostra). A integridade membranar foi confirmada por nanocitometria de fluxo (laser violeta de 405 nm) e por microscopia de fluorescência (*C. subtsugae*), utilizando-se o marcador lipofílico CellMask™ Deep Red. A morfologia foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET; 80 kV, contraste negativo com acetato de uranila a 3%, ≥ 5 micrografias/amostra).

Análise proteica e proteômica

A concentração de proteínas totais foi quantificada pelo ensaio BCA e os perfis proteicos foram analisados por SDS-PAGE a 15% com coloração por prata. Para a proteômica quantitativa *label-free* (três réplicas biológicas independentes das frações de bEVs e proteínas solúveis de cada espécie), as

proteínas foram digeridas pelo método FASP (*Filter-Assisted Sample Preparation*) e submetidas à análise por LC-MS/MS.

Análise estatística e bioinformática

As distribuições de tamanho (TRPS e nanofluorometria) foram comparadas pelo teste de χ^2 de homogeneidade, enquanto os diâmetros (médio e modal) e as concentrações de partículas foram avaliados pelo teste t não pareado com correção de Welch. Os dados proteômicos passaram por normalização por estabilização de variância, imputação de valores ausentes e análise de abundância diferencial por testes t moderados com correção de Benjamini-Hochberg ($p_{\text{adj}} < 0{,}05$ e $|\log_2(\text{fold change})| > 1$). Realizaram-se análises de PCA, agrupamento hierárquico e enriquecimento funcional por Ontologia Gênica (GO) através dos softwares Izon Control Suite, FlowJo, ImageJ, Progenesis QI for Proteomics, PEAKS Studio e ambiente R ($\alpha = 0{,}05$).

RESULTADOS

O protocolo empregado permitiu a obtenção de frações enriquecidas em vesículas extracelulares bacterianas (bEVs) de *Chromobacterium subtsugae* e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, após as etapas sequenciais de clarificação, ultrafiltração e cromatografia de exclusão por tamanho (SEC). A separação cromatográfica possibilitou a recuperação eficiente de frações distintas, separando as bEVs (etapas iniciais de eluição) das proteínas solúveis subsequentes.

A análise por Rastreamento de Pulsos Resistivos Ajustáveis (TRPS) demonstrou diferenças significativas na distribuição de tamanho das partículas (χ^2; $p < 0{,}0001$). As vesículas de *C. subtsugae* apresentaram uma distribuição mais ampla e com maior frequência em faixas menores, enquanto *B. thuringiensis* exibiu distribuição mais homogênea em faixa intermediária. Apesar disso, os diâmetros médios foram semelhantes (~132 nm para *C. subtsugae* e ~139 nm para *B. thuringiensis*). As concentrações finais também mantiveram equivalência, atingindo aproximadamente $2{,}9 \times 10^{12}$ partículas/mL e $2{,}8 \times 10^{12}$ partículas/mL, respectivamente.

A nanocitometria de fluxo com o marcador lipofílico CellMask™ Deep Red confirmou a integridade membranar nas frações vesiculares. O controle em PBS e a fração de vazio apresentaram sinal de fundo mínimo (~0,20%), enquanto as preparações de *B. thuringiensis* e *C. subtsugae* registraram 18,0% e 14,3% de positividade, respectivamente (dados corroborados por microscopia de fluorescência). Adicionalmente, a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) confirmou a presença de estruturas vesiculares organizadas: *B. thuringiensis* apresentou morfologia predominantemente esférica ou em formato de taça (*cup-shaped*) e dimensão uniforme, enquanto *C. subtsugae* revelou maior heterogeneidade morfológica e densidade de partículas. Em contrapartida, as frações solúveis exibiram essencialmente material amorfo. Notavelmente, as bEVs de *C. subtsugae* preservaram sua integridade morfológica após 120 dias de armazenamento a 4 °C.

O perfil proteico em SDS-PAGE evidenciou padrões nitidamente distintos. Em *B. thuringiensis*, as bEVs apresentaram bandas proeminentes na faixa de 30 a 55 kDa, enquanto a fração solúvel exibiu ampla distribuição (15 a 100 kDa). Em *C. subtsugae*, a fração enriquecida em bEVs revelou um perfil de maior complexidade (bandas entre 10 e 180 kDa), divergente de sua fração solúvel.

A análise proteômica quantitativa *label-free* reforçou fortemente essa segregação. Para *B. thuringiensis*, a Análise de Componentes Principais (PCA) demonstrou separação nítida, com o primeiro (PC1) e o terceiro (PC3) componentes explicando 33,2% e 19,5% da variância total, sustentada pela Análise de Agrupamento Hierárquico. Em *C. subtsugae*, a diferenciação entre as frações foi ainda mais pronunciada: PC1 e PC3 explicaram 82,5% e 6,6% da variância, respectivamente.

Em conjunto, a concordância dos parâmetros físico-químicos, ultraestruturais e proteômicos comprova a eficácia do protocolo multinível para obter preparações purificadas e estáveis de bEVs de

ambas as bactérias, fornecendo uma base metodológica robusta para futuros ensaios de controle biológico contra o percevejo-marrom (*Euschistus heros*).

CONCLUSÃO

O protocolo empregado possibilitou o isolamento e a purificação de vesículas extracelulares bacterianas produzidas por *Chromobacterium subtsugae* e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, permitindo a obtenção de frações enriquecidas em bEVs com elevado grau de pureza. A combinação sequencial de clarificação, ultrafiltração e cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) garantiu a efetiva partição entre as frações vesiculares e as frações enriquecidas em proteínas solúveis.

As análises por TRPS, nanocitometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão ratificaram atributos físico-químicos e ultraestruturais característicos de estruturas vesiculares, enquanto a SDS-PAGE e a proteômica quantitativa demonstraram perfis proteicos distintos em relação à fração solúvel. Esses achados comprovam a reprodutibilidade e a aplicabilidade da abordagem metodológica para ambas as espécies bacterianas.

Em síntese, o estudo estabelece uma base metodológica sólida para a obtenção e caracterização de bEVs de microrganismos entomopatogênicos. As preparações purificadas obtidas subsidiarão investigações futuras sobre a estabilidade, composição funcional e mecanismos de ação biológica dessas vesículas, consolidando seu potencial como ferramentas biotecnológicas promissoras para o manejo integrado do percevejo-marrom (*Euschistus heros*) na cultura da soja.

REFERÊNCIAS

Cimi, M. E., Ribeiro, D. G., Nascimento, Y. O., Reis, M. C. G. dos, Ribeiro, B. B. da S., Freitas, E. L. de, Sales, R. M. M., Lessa, C. C., Costa, R. A. da, Castro, M. T. de, Radicchi, M. A., Bao, S. N., Fontes, W., Pereira, R. W., Pontes, R. G. M. S. de, Felipe, M. S. S., & Oliveira, G. P. de. (2026). *Bacterial extracellular vesicles from Chromobacterium subtsugae and Bacillus thuringiensis as cell-free bioinsecticidal nanocarriers against the soybean pest Euschistus heros*. bioRxiv. https://doi.org/10.64898/2026.08.07.743497

Martin, P. A. W., Gundersen-Rindal, D., Blackburn, M., & Buyer, J. (2007). *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57*(5), 993–999. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64611-0

Veerman, R. E., Teeuwen, L., Czarnewski, P., Güclüler Akpinar, G., Sandberg, A. S., Cao, X., Pernemalm, M., Orre, L. M., Gabrielsson, S., & Eldh, M. (2021). Molecular evaluation of five different isolation methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and subcellular origin. *Journal of Extracellular Vesicles, 10*(9), e12128. https://doi.org/10.1002/jev2.12128

Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., Nolte-'t Hoen, E. N. M., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M. H. M., & Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles, 2*(1), 20360. https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360

Zhang, Y., Li, X., Tian, H., An, B., Yan, B., & Cai, J. (2022). Vegetative insecticidal protein Vip3Aa is transported via membrane vesicles in *Bacillus thuringiensis* BMB171. *Toxins, 14*(7), 480.

Financiamento: CNPq, No. 21/2024 – Programa Conhecimento Brasil: Atração e Fixação de Talentos; de GPOJ