



ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE *CITRUS LIMON*

Mariana Souza Diniz Santos¹; Gabriella Alves Santos Jardim²; Rinaldo Wellerson Pereira²

¹Medicina - Universidade Católica de Brasília;

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

E-mail: marianasouza.santos@a.ucb.br ; gabriella.jardim@a.ucb.br ; rinaldo@p.ucb.br

RESUMO

Este estudo teve como objetivo obter e caracterizar físico-quimicamente partículas compatíveis com vesículas extracelulares (EVs) derivadas de *Citrus limon*. Frutos maduros foram submetidos à extração do suco, clarificação, filtração por fluxo tangencial e ultracentrifugação. A caracterização foi realizada por quantificação de proteínas pelo método BCA, citometria de fluxo de nanopartículas e cálculo da razão partícula/proteína. Foram obtidas concentrações proteicas médias de 260,9 e 215,8 µg/mL. A citometria demonstrou $1,09 \times 10^{11}$ partículas/mL, com predominância entre 100 e 150 nm. A razão partícula/proteína foi de $4,62 \times 10^8$ partículas/µg de proteína. Os resultados indicam a obtenção de uma preparação nanovesicular compatível com EVs, cuja identidade requer confirmação por análises complementares.

Palavras-chave: vesículas extracelulares. *Citrus limon*. nanopartículas.

INTRODUÇÃO

As vesículas extracelulares (EVs) são partículas delimitadas por uma bicamada lipídica, capazes de transportar proteínas, lipídios, metabólitos e ácidos nucleicos, participando de processos de comunicação e regulação celular (Welsh et al., 2024; Théry et al., 2006). Entre as fontes emergentes dessas estruturas, destacam-se as vesículas extracelulares derivadas de plantas (PDEVs), investigadas pelo transporte de moléculas bioativas e por seu potencial biotecnológico (Raimondo et al., 2015; Urzì et al., 2023; Yuan et al., 2025).

Nesse contexto, *Citrus limon* apresenta particular interesse por sua composição rica em compostos bioativos, como flavonoides, compostos fenólicos e vitamina C. Estudos demonstram que nanovesículas derivadas de limão podem apresentar propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras e antitumorais (Raimondo et al., 2015; Urzì et al., 2023; Gasparro et al., 2024). Entretanto, ainda existem desafios relacionados à padronização dos métodos de isolamento e caracterização dessas partículas de origem vegetal. As recomendações MISEV2023 destacam a importância da utilização de abordagens complementares para aumentar a confiabilidade e a reprodutibilidade dos estudos com EVs (Welsh et al., 2024).

Diante dessa lacuna, torna-se relevante estabelecer protocolos capazes de concentrar e caracterizar partículas compatíveis com EVs derivadas de *Citrus limon*, contribuindo para sua investigação e para futuras aplicações biotecnológicas.

OBJETIVO



Obter e caracterizar físico-quimicamente partículas compatíveis com vesículas extracelulares derivadas de *Citrus limon*, utilizando um protocolo integrado de processamento, concentração e análise das partículas obtidas a partir do suco do fruto.

MÉTODO

O estudo foi conduzido como investigação experimental preliminar, com obtenção e caracterização físico-química de partículas a partir de suco de *Citrus limon*.

Obtenção e preparo do suco. Foram utilizados frutos maduros de *Citrus limon* adquiridos no comércio local. Após a lavagem, os frutos foram submetidos à prensagem manual, e o suco obtido foi filtrado em malha de algodão para remoção de polpa grosseira e resíduos sólidos, totalizando 300 mL (Urzi et al., 2023).

Obtenção e concentração de partículas compatíveis com EVs. O suco foi submetido a etapas sequenciais de clarificação, filtração e concentração. Inicialmente, foi centrifugado a $3.000 \times g$ por 15 minutos e filtrado em peneira de nylon de 70 μm . O filtrado foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 1 hora a 4 °C, filtrado em membrana de 0,45 μm , centrifugado a $16.500 \times g$ por 3 horas e filtrado em membrana de 0,22 μm (Urzi et al., 2023). O material clarificado foi submetido à filtração por fluxo tangencial (TFF) com membrana de polissulfona de 100 kDa, sob pressão transmembranar de aproximadamente 0,6 bar. Os 300 mL iniciais foram concentrados até 50 mL, seguidos de diafiltração com PBS por 5 minutos, obtendo-se 40 mL de concentrado. Por fim, o concentrado foi ultracentrifugado a $100.000 \times g$ por 105 minutos, e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de PBS (Urzi et al., 2023; Visan et al., 2022).

Caracterização físico-química. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método BCA, utilizando o Pierce® BCA Protein Assay Kit. Após lise das amostras com tampão RIPA, a concentração proteica foi determinada por leitura da absorbância a 562 nm, utilizando curva padrão de BSA. A concentração e a distribuição de tamanho das partículas foram avaliadas por citometria de fluxo de nanopartículas utilizando o CytoFLEX S (Beckman Coulter). As amostras foram diluídas em DPBS e analisadas com microesferas de calibração e V-SSC como parâmetro de detecção. Os dados foram processados pelos softwares FCMPass e FlowJo (Morales-Kastresana & Jones, 2017; Welsh et al., 2020). A razão partícula/proteína foi calculada pela relação entre a concentração de partículas (partículas/mL) e a concentração de proteínas ($\mu g/mL$), sendo tratada como parâmetro operacional e comparativo da preparação, sem classificação absoluta de pureza (Webber & Clayton, 2013).

RESULTADOS

A obtenção da preparação foi acompanhada pela observação macroscópica de um pellet translúcido e gelatinoso após a ultracentrifugação; esse achado é apresentado apenas como observação do processamento e não como evidência de identidade vesicular. A Tabela 1 apresenta os principais parâmetros obtidos.

Tabela 1

Principais parâmetros da caracterização físico-química

Parâmetro	Resultado
Proteína – Amostra 1	$260,9 \pm 93,7 \mu g/mL$
Proteína – Amostra 2	$215,8 \pm 24,7 \mu g/mL$
Concentração de partículas	$1,09 \times 10^{11}$ partículas/mL
Distribuição predominante	100–150 nm
Razão partícula/proteína	$4,62 \times 10^8$ partículas/ μg de proteína



Nota. Valores de proteína apresentados como média $\pm$ desvio-padrão, conforme registros experimentais. A razão partícula/proteína corresponde ao valor médio informado para a preparação.
Fonte: dados do estudo.

A quantificação pelo método BCA demonstrou concentrações proteicas médias de $260,9 \pm 93,7 \mu\text{g/mL}$ na Amostra 1 e $215,8 \pm 24,7 \mu\text{g/mL}$ na Amostra 2. A presença de proteína demonstra material proteico mensurável na preparação, mas o BCA não distingue proteínas associadas às partículas daquelas solúveis e eventualmente co-isoladas, reforçando a necessidade de métodos complementares (Webber & Clayton, 2013; Welsh et al., 2024). A citometria de fluxo de nanopartículas revelou concentração de $1,09 \times 10^{11}$ partículas/mL, com predominância entre 100 e 150 nm. Essa faixa é compatível com dimensões de pequenas EVs, mas o tamanho, isoladamente, não confirma identidade vesicular. A utilização de microesferas de calibração e V-SSC contribuiu para a avaliação da população detectada (Morales-Kastresana & Jones, 2017; Welsh et al., 2020). A razão partícula/proteína foi de $4,62 \times 10^8$ partículas/ μg de proteína. Esse valor deve ser interpretado como índice operacional e comparativo, pois a razão pode refletir também o co-isolamento de proteínas e não permite, isoladamente, inferir pureza ou identidade das partículas (Webber & Clayton, 2013). Em conjunto, os resultados são compatíveis com a obtenção de uma preparação contendo partículas nanométricas compatíveis com EVs de *Citrus limon*. Entretanto, como a caracterização realizada foi físico-química e não incluiu evidência morfológica ou bioquímica específica de identidade vesicular, os achados devem ser considerados preliminares, sendo necessárias análises complementares para confirmação da natureza das partículas (Welsh et al., 2024).

CONCLUSÃO

O protocolo empregado concentrou, a partir do suco de *Citrus limon*, uma preparação contendo partículas com predominância estimada entre 100 e 150 nm e concentração de $1,09 \times 10^{11}$ partículas/mL. As concentrações de proteína e a razão partícula/proteína constituem parâmetros operacionais da preparação e podem refletir co-isolamento de material proteico. Os resultados são compatíveis com a presença de partículas nanovesiculares, mas não confirmam sua identidade como vesículas extracelulares. A caracterização complementar, incluindo evidências morfológicas e bioquímicas e controles de componentes não vesiculares, será necessária para confirmar sua natureza e avaliar a eficiência do protocolo.

REFERÊNCIAS

- Gasparro, R., Gambino, G., Duca, G., Di Majo, D., Di Liberto, V., Tinnirello, V., Urone, G., Ricciardi, N., Frinchi, M., Rabienezhad Ganji, N., Vergilio, G., Zummo, F. P., Rappa, F., Fontana, S., Conigliaro, A., Sardo, P., Ferraro, G., Alessandro, R., & Raimondo, S. (2024). Protective effects of lemon nanovesicles: Evidence of the Nrf2/HO-1 pathway contribution from in vitro hepatocytes and in vivo high-fat diet-fed rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 180, 117532. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117532>
- Morales-Kastresana, A., & Jones, J. C. (2017). Flow cytometric analysis of extracellular vesicles. In A. F. Hill (Ed.), *Exosomes and microvesicles: Methods and protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 1545, pp. 215–225). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6728-5_16
- Raimondo, S., Naselli, F., Fontana, S., Monteleone, F., Lo Dico, A., Saieva, L., Zito, G., Flugy, A., Manno, M., Di Bella, M. A., De Leo, G., & Alessandro, R. (2015). Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-



- mediated cell death. *Oncotarget*, 6(23), 19514–19527. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4004>
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1), 3.22.1–3.22.29. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
- Urzi, O., Cafora, M., Rabienezhad Ganji, N., Tinnirello, V., Gasparro, R., Raccosta, S., Manno, M., Corsale, A. M., Conigliaro, A., Pistocchi, A., Raimondo, S., & Alessandro, R. (2023). Lemon-derived nanovesicles achieve antioxidant and anti-inflammatory effects activating the AhR/Nrf2 signaling pathway. *iScience*, 26(7), 107041. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107041>
- Visan, K. S., Lobb, R. J., Ham, S., Lima, L. G., Palma, C., Chai Pei Zhi, E., Wu, L.-Y., Gowda, H., Datta, K. K., Hartel, G., Salomon, C., & Möller, A. (2022). Comparative analysis of tangential flow filtration and ultracentrifugation, both combined with subsequent size exclusion chromatography, for the isolation of small extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(9), e12266. <https://doi.org/10.1002/jev2.12266>
- Webber, J., & Clayton, A. (2013). How pure are your vesicles? *Journal of Extracellular Vesicles*, 2, e19861. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.19861>
- Welsh, J. A., Horak, P., Wilkinson, J. S., Ford, V. J., Jones, J. C., Smith, D., Holloway, J. A., & Englyst, N. A. (2020). FCMPASS software aids extracellular vesicle light scatter standardization. *Cytometry Part A*, 97(6), 569–581. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23782>
- Welsh, J. A., Goberdhan, D. C. I., O'Driscoll, L., Buzas, E. I., Blenkiron, C., Bussolati, B., Cai, H., Di Vizio, D., Driedonks, T. A. P., Erdbrügger, U., Falcon-Perez, J. M., Fu, Q.-L., Hill, A. F., Lenassi, M., Lim, S. K., Mahoney, M. G., Mohanty, S., Möller, A., Nieuwland, R., ... Witwer, K. W. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2023 (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*, 13(2), e12404. <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>
- Yuan, S., Jin, M., Zhang, Y., Zhang, M., Yuan, M., Ding, X., & Wang, J. (2025). Extracellular vesicles in skin: Biological function and therapeutic potential. *International Journal of Nanomedicine*, 20, 11211–11233. <https://doi.org/10.2147/IJN.S548986>