



VESÍCULAS EXTRACELULARES DE ESPINAFRE: COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS DE LAVAGEM DE FLUIDO APOPLASTO

Ana Luiza Augusto Itacaramby¹; Rinaldo Wellerson Pereira²

¹Biomedicina – Universidade Católica de Brasília;

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

E-mail: ana.itacaramby@a.ucb.br; rinaldo@p.ucb.br.

RESUMO

As vesículas extracelulares (EVs) vegetais apresentam potencial para aplicações biotecnológicas, mas sua obtenção depende de protocolos de extração adequados. Este estudo comparou três protocolos de lavagem do fluido apoplástico (AWF) de folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*): Erlenmeyer (AWF-E), seringa (AWF-S) e ponteira (AWF-P). As EVs foram caracterizadas quanto ao tamanho e à concentração de partículas por TRPS, além do perfil proteico por SDS-PAGE e da concentração de proteínas pelo método BCA. Todos os protocolos permitiram obter EVs predominantemente entre 60 e 100 nm, sem diferença significativa na concentração de partículas. Entretanto, houve diferença significativa no rendimento proteico, com maior concentração no AWF-S ($p = 0,005$). Assim, o protocolo por seringa apresentou o melhor desempenho entre os métodos avaliados, embora todos apresentem elevada complexidade operacional e baixa escalabilidade.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares. Espinafre. Fluido de lavagem apoplasto. Isolamento. Extração.

INTRODUÇÃO

As vesículas extracelulares (EVs) são estruturas delimitadas por bicamada lipídica, liberadas por diferentes tipos celulares e envolvidas na comunicação intercelular e no transporte de biomoléculas. Em plantas, essas vesículas participam de processos de sinalização, defesa contra patógenos e resposta a estresses ambientais, despertando interesse para diferentes aplicações biotecnológicas (Teng et al., 2018; Zhao et al., 2023).

O fluido apoplástico (Apoplastic Washing Fluid – AWF), localizado entre a membrana plasmática e a parede celular, constitui uma fonte estratégica para a obtenção de EVs vegetais, possibilitando sua recuperação sem a necessidade de ruptura celular. Entretanto, diferentes estratégias de obtenção e recuperação do AWF podem influenciar o rendimento e as características das vesículas obtidas (Jokhio et al., 2024).

Apesar do crescente interesse pelas EVs vegetais, ainda existem diferenças entre os protocolos utilizados para obtenção do fluido apoplástico, e a influência dessas estratégias sobre o rendimento das vesículas obtidas permanece pouco padronizada. Dessa forma, a comparação entre diferentes métodos de lavagem do AWF é relevante para identificar procedimentos mais eficientes e reprodutíveis, especialmente quando se considera a utilização dessas vesículas em estudos biotecnológicos (Zhao et al., 2023; Fang et al., 2023).

Diante disso, este estudo teve como objetivo comparar três protocolos de lavagem do fluido apoplástico de folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*) para obtenção de vesículas extracelulares, avaliando o tamanho, a concentração de partículas e o rendimento proteico das EVs isoladas.

OBJETIVO



Comparar três protocolos de lavagem do fluido apoplástico de folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*) para obtenção de vesículas extracelulares, avaliando o tamanho, a concentração de partículas e o rendimento proteico das EVs isoladas.

MÉTODO

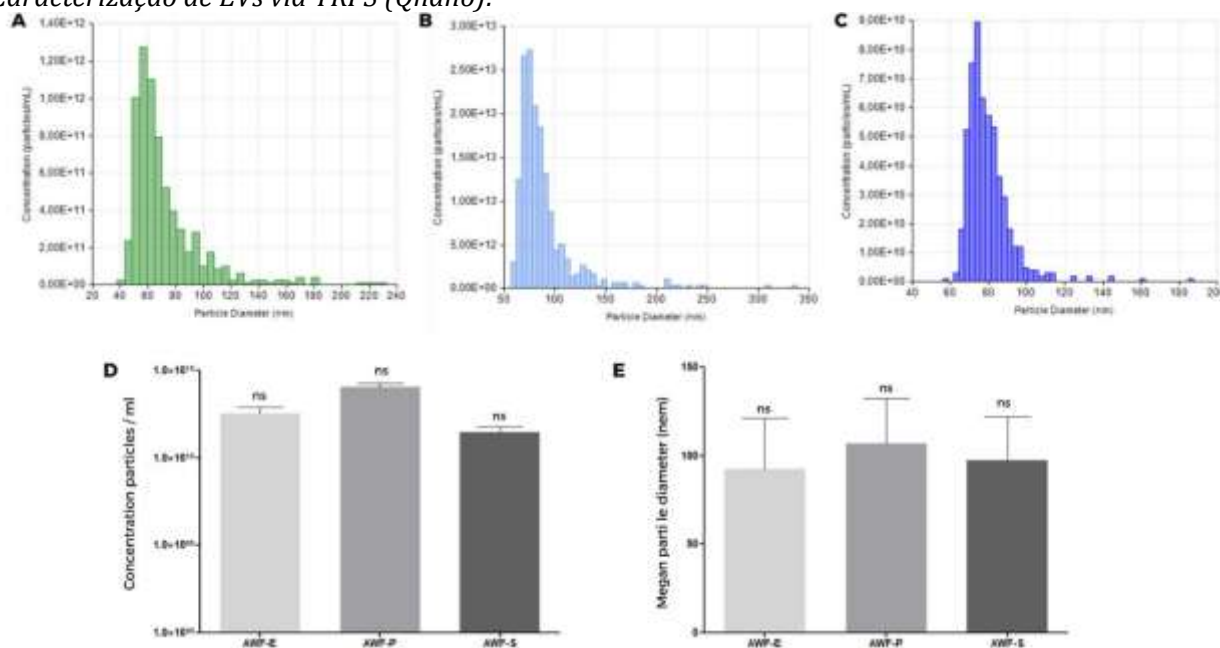
Foram utilizadas folhas frescas de espinafre (*Spinacia oleracea*), previamente higienizadas com água destilada. Foram avaliados três protocolos de obtenção do fluido apoplástico: AWF-E, AWF-S e AWF-P. Nos protocolos AWF-S e AWF-P, as folhas foram submetidas à infiltração com PBS sob pressão negativa, seguida da recuperação do fluido em seringas de 3 mL ou ponteiros de 1000 μ L adaptadas para centrifugação. No protocolo AWF-E, foi realizada lavagem das folhas em solução tampão sob pressão negativa com auxílio de bomba de vácuo.

Após a obtenção do AWF, as amostras foram submetidas à centrifugação diferencial a $500 \times g$ por 10 minutos, $2.000 \times g$ por 10 minutos e $10.000 \times g$ por 60 minutos, seguida de filtração em membranas de 0,45 e 0,22 μ m e concentração por ultrafiltração utilizando membranas de 100 kDa. As EVs foram caracterizadas por Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS), para determinação do tamanho e concentração de partículas, e por SDS-PAGE e BCA, para avaliação e quantificação proteica. Os dados foram analisados por ANOVA One-Way, seguida do teste de Tukey, considerando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Figura 1

Caracterização de EVs via TRPS (Qnano):



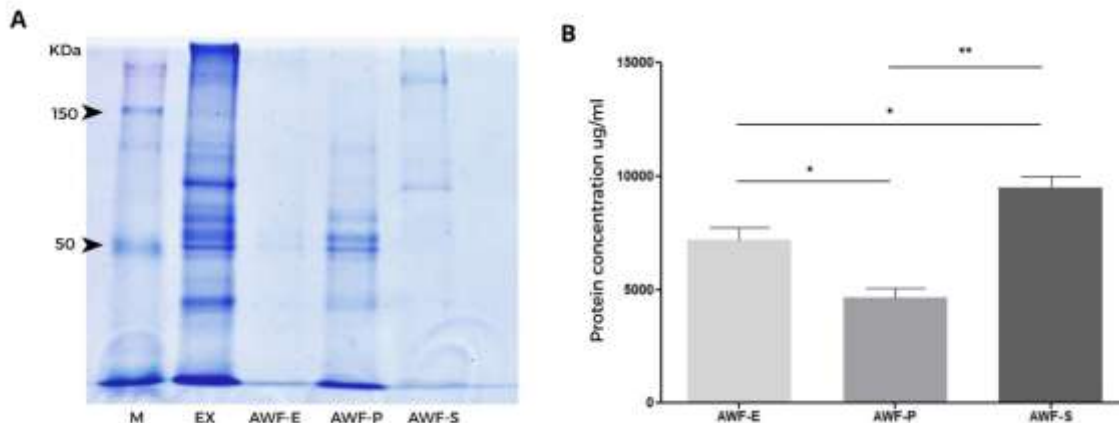
Nota. Distribuição de tamanho e concentração de partículas de EVs isoladas por diferentes protocolos (AWF-E, AWF-P e AWF-S). (D) Comparação da concentração total de partículas/mL entre os protocolos. (E) Valores médios de diâmetro das vesículas isoladas, consistentes entre os protocolos, com partículas predominantemente na faixa de 100 nm. A análise estatística (ANOVA One Way + Tukey) não mostrou diferenças significativas ($p > 0,05$).



Fonte: Elaboração própria (2026).

Figura 2

Análise e quantificação proteica das EVs isoladas



Nota. (A) Perfil proteico por SDS-PAGE dos protocolos AWF-E, AWF-P e AWF-S. (B) Quantificação proteica por BCA, evidenciando maior rendimento no AWF-S ($p = 0,005$).

Fonte: Elaboração própria (2026).

A caracterização por TRPS demonstrou que as EVs obtidas nos três protocolos apresentaram distribuição de tamanho predominantemente entre 60 e 100 nm, sem diferença significativa entre os grupos. Da mesma forma, a concentração de partículas por mililitro não apresentou diferença estatisticamente significativa entre AWF-E, AWF-P e AWF-S, indicando desempenho semelhante quanto à recuperação de partículas.

A análise por SDS-PAGE demonstrou diferenças na intensidade das bandas proteicas entre os protocolos. Na quantificação pelo método BCA, foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,005$), com maior rendimento proteico no protocolo AWF-S, seguido pelo AWF-E, enquanto o AWF-P apresentou o menor rendimento. Esses resultados indicam que, apesar da concentração de partículas ser semelhante entre os métodos, o protocolo utilizado para obtenção do AWF influencia o conteúdo proteico recuperado.

CONCLUSÃO

Os três protocolos avaliados foram capazes de obter vesículas extracelulares de espinafre dentro da faixa nanométrica observada, sem diferenças significativas na concentração de partículas. Entretanto, o protocolo AWF-S apresentou o maior rendimento proteico e, nas condições avaliadas, mostrou o melhor desempenho entre os métodos testados. Apesar disso, a elevada complexidade operacional e a baixa escalabilidade dos protocolos representam limitações para sua aplicação em maior escala. Os resultados contribuem para a escolha de um protocolo mais adequado para a obtenção de EVs de espinafre e fornecem uma base para o aprimoramento das etapas de extração e caracterização em estudos futuros.

REFERÊNCIAS



V Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica

IV Mostra do **Stricto Sensu**

Universidade Católica de Brasília

- Fang, Z., Song, M., Lai, K., Cui, M., Yin, M., & Liu, K. (2023). Kiwi-derived extracellular vesicles for oral delivery of sorafenib. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 191, 106604. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106604>
- Jokhio, S., Peng, I., & Peng, C.-A. (2024). Extracellular vesicles isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves reveal characteristics of mammalian exosomes. *Protoplasma*, 261(5), 1025–1033. <https://doi.org/10.1007/s00709-024-01954-x>
- Teng, Y., Ren, Y., Sayed, M., Hu, X., Lei, C., Kumar, A., Hutchins, E., Mu, J., Deng, Z., Luo, C., Sundaram, K., Sriwastva, M. K., Zhang, L., Hsieh, M., Reiman, R., Haribabu, B., Yan, J., Jala, V. R. R., Miller, D. M., Van Keuren-Jensen, K., Merchant, M. L., McClain, C. J., Park, J. W., Egilmez, N. K., & Zhang, H.-G. (2018). Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota. *Cell Host & Microbe*, 24(5), 637–652.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.001>
- Zhao, Q., Liu, G., Liu, F., Xie, M., Zou, Y., Wang, S., Guo, Z., Dong, J., Ye, J., Cao, Y., Zheng, L., & Zhao, K. (2023). An enzyme-based system for extraction of small extracellular vesicles from plants. *Scientific Reports*, 13, 13931. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41224-z>

Financiamento: Programa de Bolsas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica 2025 da Universidade Católica de Brasília, PIT/UCB – 015/2025.