



AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO FLUIDO APOPLÁSTICO E DO EXTRATO BRUTO NO ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM DIFERENTES VARIEDADES DE ALFACE (*LACTUCA SATIVA*)

Ana Rita França Borges¹; Rinaldo Wellerson Pereira²

¹Biomedicina - Universidade Católica de Brasília;

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

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

RESUMO

Esse trabalho investigou a eficiência do isolamento de Vesículas Extracelulares (EVs) a partir de tecidos vegetais, utilizando como modelo a *Lactuca sativa* (alface). O estudo comparou o rendimento e a pureza entre o fluido apoplástico (extraído via infiltração-centrifugação) e o extrato bruto (obtido por maceração/homogeneização) em três variedades: Crespa, Americana e Romana. As amostras foram caracterizadas quanto à concentração proteica e perfil eletroforético (SDS-PAGE). Os resultados indicaram que a variedade Crespa apresentou uma biomassa foliar com maior densidade de vesículas e rendimento proteico superior, possivelmente devido à sua arquitetura foliar que favorece a secreção para o espaço extracelular. A escolha da variedade botânica e do método de extração são determinantes para a qualidade das EVs isoladas, sendo o fluido apoplástico mais específico para a recuperação de vesículas puras. Observa-se a influência do método de isolamento e das características estruturais das variedades sobre o rendimento e a pureza das EVs.

Palavras-chave: Vesículas Extracelulares (EVs). *Lactuca sativa* (alface). Fluido apoplástico.

INTRODUÇÃO

As Vesículas Extracelulares (EVs) são estruturas nanométricas delimitadas por bicamada fosfolipídica que atuam como mediadoras essenciais na comunicação intercelular, transportando proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. No Reino Plantae, essas vesículas desempenham papéis vitais no desenvolvimento e na defesa contra estresses bióticos e abióticos (Lian et al., 2022). O interesse pelas vesículas vegetais cresceu devido ao seu potencial biotecnológico. No entanto, sua extração em plantas enfrenta desafios impostos pela parede celular rígida, exigindo a padronização de protocolos que permitam o isolamento tanto do citoplasma (extrato bruto) quanto do apoplasto, espaço intersticial entre a membrana plasmática e a parede celular.

A eficiência desse isolamento depende das características fisiológicas e da arquitetura foliar da espécie. A escolha das variedades Crespa, Americana e Romana permitiu observar como o fenótipo foliar influencia a dinâmica do fluido apoplástico (Rutter & Innes, 2017). A alface Crespa possui limbo foliar com margens onduladas e maior dobramento, resultando em área de superfície expandida e rede de espaços intercelulares mais acessível à infiltração de soluções. A alface Americana apresenta folhas compactas e cerosas, formando barreira física à entrada de tampões de extração. Já a Romana caracteriza-se por folhas alongadas e firmes, com coloração verde mais escura nas extremidades e textura mais rígida.

Essas diferenças fisiológicas sugerem que tecidos com maior exposição superficial e atividade metabólica na interface externa, como os da variedade Crespa, possuem maior taxa de secreção de EVs para o extrato e apoplasto. Assim, a morfologia da folha correlaciona-se diretamente com o



rendimento proteico e a integridade das vesículas recuperadas, sendo parâmetro crítico para a reprodutibilidade de protocolos de isolamento em larga escala (Pocsfalvi et al., 2018).

OBJETIVO

Analisar o desempenho de técnicas de extração de Vesículas Extracelulares (EVs) utilizando a *Lactuca sativa* (alface) como modelo, tendo dois métodos de isolamento (fluido apoplástico e extrato bruto) aliados às características estruturais das variedades Crespa, Americana e Romana sobre o rendimento proteico e a pureza das EVs. Com isso, busca-se determinar a melhor abordagem para otimizar a recuperação e a qualidade dessas nanopartículas vegetais.

MÉTODO

A metodologia para o isolamento das vesículas extracelulares (EVs) de *Lactuca sativa* (variedades Crespa, Americana e Romana) baseou-se na comparação entre dois métodos de extração. Para obtenção do fluido apoplástico (AWF), as folhas foram submetidas à vácuo-infiltração, imersas em tampão de extração e colocadas em câmara de vácuo para substituição do ar intracelular pelo líquido. Após a infiltração, as folhas foram secas e centrifugadas em baixa rotação para coleta do fluido intersticial.

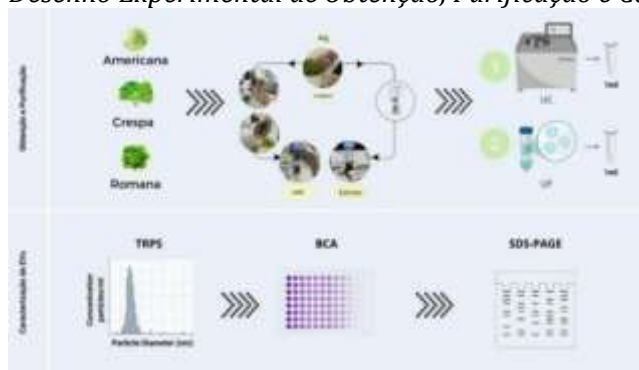
Paralelamente, o extrato bruto foi obtido por homogeneização mecânica do tecido foliar em tampão fosfato, representando o conteúdo celular total. Os extratos foram purificados por centrifugação diferencial: 500 g por 10 min a 4 °C (remoção de detritos celulares e fibras); o sobrenadante foi submetido a 2000 g por 20 min a 4 °C (sedimentação de organelas e fragmentos de membrana); e, por fim, a 10.000 g por 60 min a 4 °C para o isolamento efetivo. O pellet resultante, contendo as EVs, foi ressuspensionado para as etapas posteriores de caracterização.

Na ultrafiltração (UF), as amostras foram filtradas em membranas de exclusão por tamanho, retraindo as nanopartículas e eliminando moléculas menores e solventes, com preservação eficiente da integridade proteica. Já na ultracentrifugação (UC), as amostras foram submetidas a 100.000 g, promovendo a sedimentação das vesículas (pellet).

A etapa final consistiu na análise qualitativa e quantitativa das amostras isoladas: a distribuição de tamanho e a concentração das partículas foram analisadas via Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), gerando os histogramas apresentados nos resultados. Por fim, a integridade e a diversidade proteica das frações foram verificadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), possibilitando a comparação visual do padrão de bandas proteicas entre as variedades e os métodos empregados. Conforme mostrado na Figura 1 que representa o desenho experimental.

Figura 1

Desenho Experimental de Obtenção, Purificação e Caracterização de EVs





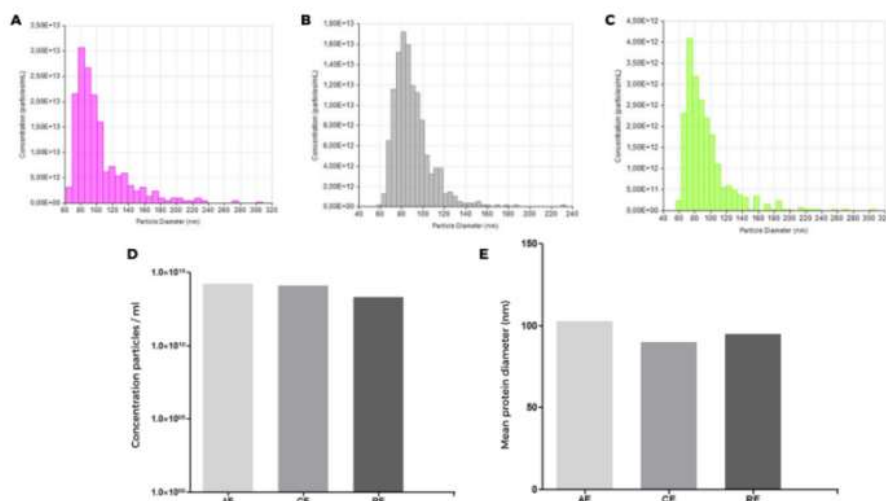
Nota. Desenho experimental
Fonte: Autoria própria (2026).

RESULTADOS

Os dados obtidos revelaram que a variedade de alface Crespa apresentou o maior rendimento tanto em concentração proteica (método de Bradford) quanto em densidade de partículas nanométricas (NTA). A análise qualitativa por SDS-PAGE corroborou esses achados, exibindo um perfil de bandas proteicas mais intenso e definido para a variedade Crespa em comparação às variedades Americana e Romana. Ao comparar os métodos de concentração, a ultracentrifugação (UC) foi mais eficiente que a ultrafiltração (UF) na concentração das vesículas, apresentando maior intensidade das bandas no SDS-PAGE. O fluido apoplástico (AWF) apresentou maior pureza, com bandas mais claras e específicas, enquanto o extrato bruto apresentou maior quantidade de proteínas e maior presença de proteínas citoplasmáticas. A variedade Crespa destacou-se pelo maior rendimento proteico e densidade de partículas, possivelmente devido à sua morfologia foliar, que favorece a infiltração do tampão no apoplasto. As Figuras 2 e 3 apresentam, respectivamente, a distribuição das partículas e o perfil proteico.

Figura 2

Distribuição de tamanho e concentração de partículas

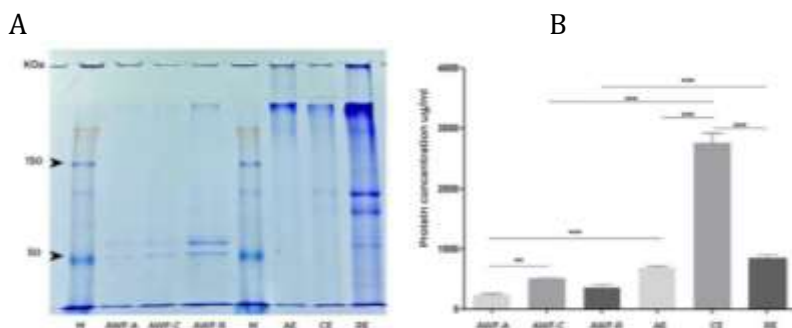


Nota. A: Americana Extrato (AE), B: Crespa Extrato (CE) e C: Romana Extrato (RE). D. Gráfico comparativo da concentração de partículas/ml. E. Gráfico comparativo da Média do diâmetro das partículas.

Fonte: Autoria própria (2026).

Figura 3

Quantificação e análise do padrão das proteínas



Nota. A: Padrão proteico Gel SDS-PAGE; M: marcador, AWF-A (apoplástico americana), AWF-C (apoplástico crespa), AWF-R (apoplástico romana), Americana Extrato (AE), Crespa Extrato (CE) e Romana Extrato (RE). B. Gráfico comparativo da concentração de proteínas das amostras. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2026).

CONCLUSÃO

A superioridade da alface Crespa e a eficiência da ultracentrifugação representam um direcionamento claro para aplicações em larga escala, com potencial de padronização e replicabilidade. Nesse contexto, o uso do fluido apoplástico (AWF) transcende a experimentação inicial e se consolida como uma abordagem tecnologicamente madura e escalável.

REFERÊNCIAS

- Lian, M. Q., Chng, W. H., Liang, J., Yeo, H. Q., Lee, C. K., Belaid, M., Tollemeto, M., Wacker, M. G., Czarny, B., & Pastorin, G. (2022). Plant-derived extracellular vesicles: Recent advancements and current challenges on their use for biomedical applications. *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(12), Article e12283. <https://doi.org/10.1002/jev2.12283>
- Pocsfalvi, G., Turiák, L., Ambrosone, A., Del Gaudio, P., Puska, G., Fiume, I., Silvestre, T., & Vékey, K. (2018). Protein biocargo of citrus fruit-derived vesicles reveals heterogeneous transport and extracellular vesicle populations. *Journal of Plant Physiology*, 229, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.07.006>
- Rutter, B. D., & Innes, R. W. (2017). Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins. *Plant Physiology*, 173(1), 728–741. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01253>

Financiamento: Universidade Católica de Brasília.