

AVALIAÇÃO DA PUREZA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES ISOLADAS DE *ENTEROCOCCUS* UTILIZANDO QUANTIFICAÇÃO POR QNANO E MICRO-BCA

**Sofia Franck Minella¹; Isabella Serpa Andrade Borges¹; Gabriella Alves Santos
Jardim³; Rinaldo Wellerson Pereira³**

¹Medicina – Universidade Católica de Brasília.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de
Brasília;

E-mail: sofia.minella@a.ucb.br; isabella.serpa@a.ucb.br; gabriella.jardim@a.ucb.br;
rinaldo@p.ucb.br

RESUMO

A pureza das vesículas extracelulares (VEs) de *Enterococcus* foi avaliada pela razão entre a concentração de partículas e proteínas totais, determinadas por qNano e Micro-BCA, respectivamente. O isolado bruto concentrado apresentou $3,60 \times 10^{10}$ partículas/mL e 362,49 µg/mL de proteínas, resultando em uma razão de $9,94 \times 10^7$ partículas/µg. Segundo os critérios de Webber e Clayton (2013), esse valor classifica a preparação como de baixa pureza. Os resultados sugerem a presença de proteínas não vesiculares na amostra, indicando a necessidade de etapas adicionais de purificação para reduzir contaminantes e melhorar a qualidade das VEs, favorecendo sua caracterização e futuras aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares. *Enterococcus*. Pureza.

INTRODUÇÃO

As vesículas extracelulares (VEs) bacterianas são estruturas nanométricas envolvidas na comunicação celular e no transporte de biomoléculas, com potencial para aplicações biomédicas e biotecnológicas (Devati et al., 2025; Konoshenko et al., 2018). O gênero *Enterococcus* destaca-se pelas propriedades imunomoduladoras de suas VEs e pela interação com a resposta inflamatória do hospedeiro (Chan et al., 2025; Gancino Guevara et al., 2026). Entretanto, a obtenção de VEs com elevada pureza é desafiadora devido à copurificação de proteínas e outros contaminantes durante o isolamento (Guerreiro et al., 2018; Konoshenko et al., 2018). Nesse contexto, a razão entre a concentração de partículas e proteínas totais constitui uma abordagem quantitativa para avaliar a pureza das preparações (Webber & Clayton, 2013). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a pureza de VEs produzidas por *Enterococcus* por meio dessa razão, contribuindo para a avaliação da qualidade das preparações.

OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar a pureza de vesículas extracelulares produzidas por *Enterococcus* por meio da razão entre a concentração de partículas e de proteínas totais, contribuindo para a padronização de protocolos de isolamento e caracterização de VEs bacterianas.

MÉTODO

A cepa de *Enterococcus* foi reidratada em meio MRS líquido e cultivada a 37 °C, seguida de isolamento em MRS ágar por esgotamento e manutenção por repiques sucessivos a cada 48 horas. A partir do terceiro repique, uma colônia isolada foi incubada em MRS líquido a 37 °C e 180 rpm por 12–18 horas; o inóculo foi então diluído para OD₆₀₀ de 0,1 em volume final de 250 mL e cultivado sob as mesmas condições até a fase exponencial (~5 horas).

Para o isolamento das vesículas extracelulares, a cultura foi clarificada por centrifugações sucessivas a 4 °C (5.000 × g por 10 min e 2.000 × g por 20 min) e filtrada em membranas de 0,45 µm e 0,22 µm. O sobrenadante foi concentrado em filtro de corte de 100 kDa (5.000 × g por 15 min a 4 °C), ressuspensionado em PBS 1X, refiltrado em 0,22 µm e purificado por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), na qual descartou-se o volume morto inicial de 2,5 mL e coletou-se a fração enriquecida de 2 mL.

A concentração de proteínas totais foi quantificada pelo ensaio Micro-BCA com padrão de BSA, enquanto o tamanho e a concentração das vesículas foram mensurados via qNano (técnica TRPS, nanoporo CPC200). A pureza foi calculada pela razão entre o número de partículas/mL e a concentração proteica (µg/mL), categorizada segundo os parâmetros de Webber e Clayton (2013).

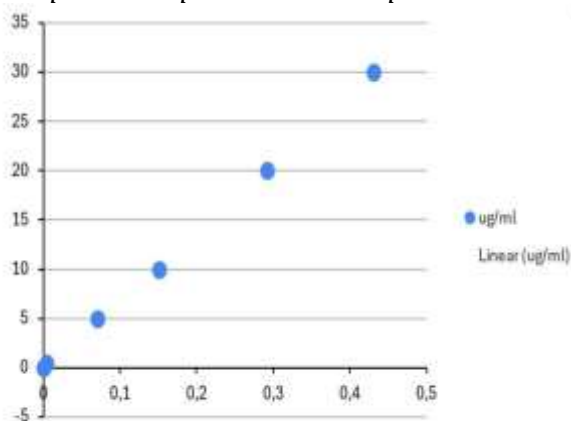
RESULTADOS

1. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo ensaio Micro-BCA utilizando BSA como padrão. A curva de calibração apresentou comportamento linear crescente, descrito pela equação $y = 0,00331x + 0,13107$, com $R^2 = 0,968$, indicando adequada linearidade para a quantificação proteica (Figura 1). Com base nessa curva, a concentração de proteínas totais no isolado de vesículas extracelulares de *Enterococcus* foi de 362,49 µg/mL, expressa em equivalentes de BSA.

Figura 1

Curva padrão de proteínas obtida pelo ensaio Micro-BCA



Nota. Curva padrão de proteínas obtida pelo ensaio Micro-BCA com BSA, apresentando linearidade crescente entre 0–30 µg/mL. A curva apresentou equação $y = 0,00331x + 0,13107$ e $R^2 = 0,968$, indicando boa linearidade e adequação do método para quantificação de proteínas nas VEs de *Enterococcus*.

Fonte: Autoria própria (2026).

2. Quantificação das vesículas extracelulares pelo sistema qNano

A quantificação e caracterização das vesículas extracelulares foram realizadas em sistema qNano (Izon Science), utilizando a técnica Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS), em triplicata. Os diâmetros modais obtidos foram de 201, 92 e 86 nm, com concentrações de $4,93 \times 10^{10}$, $3,66 \times 10^{10}$ e $2,22 \times 10^{10}$ partículas/mL, respectivamente. A média das três análises resultou em diâmetro modal de 126,3 nm e concentração de $3,60 \times 10^{10}$ partículas/mL.

3. Determinação de pureza

A suspensão analisada apresentou concentração média de $1,80 \times 10^9$ partículas/mL, correspondendo a uma razão inicial de $4,97 \times 10^6$ partículas/ μ g de proteína. No isolado concentrado, foram obtidas $3,60 \times 10^{10}$ partículas/mL e 362,49 μ g/mL de proteínas, resultando em uma razão de $9,94 \times 10^7$ partículas/ μ g, classificada como impura. Esse resultado sugere a presença de proteínas co-isoladas juntamente às vesículas extracelulares.

CONCLUSÃO

A aplicação integrada dos ensaios Micro-BCA e qNano permitiu avaliar a pureza das vesículas extracelulares de *Enterococcus*, obtendo-se $3,60 \times 10^{10}$ partículas/mL e 362,49 μ g/mL de proteínas. A razão de $9,94 \times 10^7$ partículas/ μ g classificou a preparação como impura, segundo Webber e Clayton (2013), sugerindo o co-isolamento de proteínas não vesiculares. O resultado evidencia limitações do protocolo empregado e indica a necessidade de etapas adicionais de purificação para melhorar a qualidade das preparações.

REFERÊNCIAS

- Chan, P., Huang, W., Liang, J., Yuan, Z., & Guo, L. (2025). Effect of membrane vesicles produced under different pH conditions on the ability of *Enterococcus faecalis* to tolerate stressful environments and macrophages' inflammatory response. *Journal of Bacteriology*, 207(11), e0037725. <https://doi.org/10.1128/jb.00377-25>
- Devati, M. S., Jnana, A., Kidd, S. P., Jensen, S. O., Babu, T. G. S., Upadhy, D., & Murali, T. S. (2025). Decoding bacterial extracellular vesicles: A review on isolation and characterization techniques. *Archives of Microbiology*, 208(1), 63. <https://doi.org/10.1007/s00203-025-04628-1>
- Gancino Guevara, M. A., Kardani, A., Schomisch, A., Rasheed, S., Mashayekhi, V., Saccon, E., Abdulkarimov, N., Kirilov, N. K., Junker, S., Weiss, A.-V., Koch, M., Gasparoni, G., Schneider, M., Schulze-Hentrich, J., Bischoff, M., Becker, S. L., Müller, R., Yildiz, D., Fuhrmann, G., . . . Kiemer, A. K. (2026). Extracellular vesicles derived from *Enterococcus faecalis*: Inflammatory activation does not require internalization. *Cell Communication and Signaling*, 24, 301. <https://doi.org/10.1186/s12964-026-02926-9>
- Guerreiro, E. M., Vestad, B., Steffensen, L. A., Aass, H. C. D., Saeed, M., Øvstebø, R., Costea, D. E., Galtung, H. K., & Sjøland, T. M. (2018). Efficient extracellular vesicle isolation by combining cell media modifications, ultrafiltration, and size-exclusion chromatography. *PLoS ONE*, 13(9), e0204276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204276>



Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V., & Laktionov, P. P. (2018). Isolation of extracellular vesicles: General methodologies and latest trends. *BioMed Research International*, 2018, 8545347. <https://doi.org/10.1155/2018/8545347>

Webber, J., & Clayton, A. (2013). How pure are your vesicles? *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1), 19861. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.19861>

Financiamento: Não houve financiamento para o desenvolvimento desse estudo.