

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**SÍLVIA MÓBILLE AWOYAMA**

**DESINFECÇÃO DE MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA A PARTIR  
DE UM SISTEMA HIDRODINÂMICO DESENVOLVIDO COM ÁGUA  
OZONIZADA**

**TESE DE DOUTORADO**

**DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

**São José dos Campos, fevereiro/2022**

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**SÍLVIA MÓBILLE AWOYAMA**

**DESINFECÇÃO DE MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA A PARTIR  
DE UM SISTEMA HIDRODINÂMICO DESENVOLVIDO COM ÁGUA  
OZONIZADA**

**TESE DE DOUTORADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado, da  
Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica

Orientador: Adriana Barrinha Fernandes Moretti

**São José dos Campos, fevereiro/2021**

# **UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**SÍLVIA MÓBILLE AWOYAMA**

## **DESINFECÇÃO DE MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA A PARTIR DE UM SISTEMA HIDRODINÂMICO DESENVOLVIDO COM ÁGUA OZONIZADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica. Aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

**Prof. Dr. Adriana Barrinha Fernandes Moretti**

Orientador  
Doutorado em Engenharia Biomédica  
Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Matheus Diniz Gonçalves Coêlho**

Centro Universitário FUNVIC – UNIFUNVIC

**Prof. Dr. Carlos José de Lima**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Rodrigo Alexis Lazo Osorio**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dra. Luciane Vieira Garcia**

Centro Universitário FUNVIC – UNIFUNVIC

**Prof. Dr. Leandro Procópio Alves**

Universidade Anhembi Morumbi

**São José dos Campos, fevereiro/2022**

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

## **Silvia Móbille Awoyama**

Graduada em Estética e Cosmética pela Universidade Anhembi Morumbi, Pós-graduada em MBA em Cosmetologia pela Universidade Unicastelo, Mestre em Bioengenharia pela Universidade Brasil. Docente do Curso Superior de Tecnologia em Estética e Cosmética da Faculdade UNIP(ITES) e Docente do Curso Superior em Farmácia na UNIFUNVIC.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca UAM  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

967d      Awoyama, Silvia Mobbille  
            Desinfecção de membrana amniótica humana a partir de um sistema hidrodinâmico desenvolvido com água ozonizada / Silvia Mobbille Awoyama. - 2022.  
            68f. : il.; 30cm.

            Orientador: Adriana Barrinha Fernandes Moretti.  
            Tese (Doutorado em ENGENHARIA BIOMÉDICA) - Universidade Anhembi Morumbi, São José Dos Campos, 2022.  
            Bibliografia: f.51

            1. Desinfecção de membrana . 2. Amniótica. 3. Sistema hidrodinâmico.  
            4. Água ozonizada.

CDD 610.28

Dedico esse trabalho ao meu amado pai  
Sebastião Móbille e minha amada mãe Rosália  
Rodrigues Móbille (*in memoriam*).

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela benção da minha vida e ao Mestre Jesus por ter me ensinado a ver Deus em todas as pessoas.

À minha orientadora Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti que compartilhou comigo todo conhecimento necessário para que eu pudesse desenvolver esse trabalho com paciência, respeito e amor.

Ao meu co-orientador Dr. Carlos José de Lima por todo apoio e ensinamento.

À Henrique Carvalho e à Nidia Lucia Domingues Macedo.

À Marcélia Santiago Rios pelo apoio.

Agradeço a enfermeira Vanessa Gomes Bueno, à Dra. Edna Mutareli, Dr. Edson Yorikawa e a toda a equipe de enfermagem do centro cirúrgico da maternidade da Santa Casa de Misericórdia de Pindamonhangaba.

Aos colegas da UNIFUNVIC Gervásio Amador Rosa e Pâmela Suellen dos Santos Cesário.

Aos amigos Alessandra Rister Andrade, Dr. Casé José Valise Andrade e Catarina Rodrigues da Silva.

Ao meu esposo Claudio Massakazu Awoyama, aos meus filhos Daniel Móbile Awoyama e Bianca Móbile Awoyama, a minha nora Mariana Vilela Barbosa Awoyama e minhas netas Sarah Midori Vilela Awoyama e Isabela Miuki Vilela Awoyama pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. Renato Amaro Zângaro coordenador do Programa de Engenharia Biomédica.

Ao Sr. Luciano Rodrigues do Nascimento diretor da Santa Casa de Misericórdia de Pindamonhangaba.

Ao Dr. Francisco Paulo Martins Freire diretor Técnico da Santa Casa de Misericórdia de Pindamonhangaba.

Ao CAPES pela bolsa de Doutorado.

A todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização desse estudo, meu muito obrigado.

## RESUMO

O presente estudo avaliou o uso de um Sistema Hidrodinâmico (SH) que emprega água ozonizada para a desinfecção de Membrana Amniótica Humana (MAh), além de verificar possíveis alterações morfológicas, a partir de análise histológica e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para o procedimento foram selecionados fragmentos de MAh que foram contaminados experimentalmente com *Staphylococcus aureus* ( $10^3$  UFC/mL) e submetidos durante 5 minutos ( $1,95 \text{ mg/cm}^2$  ( $\text{O}_3$ )), 10 minutos ( $3,9 \text{ mg/cm}^2$  ( $\text{O}_3$ )) e 15 minutos ( $5,85 \text{ mg/cm}^2$  ( $\text{O}_3$ )) ao processo de desinfecção. Os dados obtidos demonstraram que a partir de 10 minutos seria o tempo necessário para obter a saturação de ozônio dissolvido na água ( $2,7 \text{ mg/L}$ ), por isso, este tempo inicial foi definido para inserir as amostras de MAh no SH para a desinfecção. Os resultados da análise microbiológica da água demonstraram que não foi detectado crescimento microbiano em todas as amostras de água analisadas em 5 momentos diferentes, sendo a primeira amostra colhida após 1 minuto de funcionamento do SH; a segunda amostra após 10 minutos de circulação da água ozonizada no SH; a terceira amostra após 5 minutos de circulação da água ozonizada pelo SH, na presença da MAh contaminada; a quarta amostra após 10 minutos de circulação da água ozonizada pelo SH na presença da MAh contaminada, a quinta amostra após 15 minutos de circulação da água ozonizada pelo SH, na presença da MAh contaminada. A análise microbiológica da superfície das MAh foi realizada com o auxílio de um *swab* e demonstrou que após 5 minutos de desinfecção houve a redução de 1 Log de crescimento microbiano, enquanto, após 10 e 15 minutos houve 2 Log de redução de crescimento microbiano, indicando que a partir de 10 minutos e 15 minutos não foi detectado crescimento microbiano. Análise morfológica e da superfície revelaram que a integridade estrutural da MAh foi mantida durante o processo e sugerem o uso promissor deste sistema na desinfecção deste biomaterial. Pode-se concluir que a partir do sistema hidrodinâmico empregando água ozonizada para desinfecção de material biológico foi possível promover um fluxo de água contínuo, com regime de escoamento com comportamento transitório, o que favoreceu o arrasto e a remoção do material contaminante da superfície da MAh. As MAh possuem um grande potencial de uso nos processos de regeneração, podendo ser desinfetadas, preservadas e armazenadas para utilização em medicina regenerativa.

**Palavras-chaves:** Engenharia Biomédica água ozonizada, membrana amniótica humana (MAh), desinfecção de material biológico, sistema hidrodinâmico.

# Disinfection of Human Amniotic Membrane Using a Hydrodynamic System with Ozonated Water

## ABSTRACT

The study evaluated the use of a Hydrodynamic System (HS) that uses ozonized water for the infection of Human Amniotic Membrane (MAh), in addition to verifying possible morphological changes, from histological analysis and by Scanning Electron Microscopy (SEM). For the procedure, fragments of MAh were selected that were experimentally contaminated with *Staphylococcus aureus* (10<sup>3</sup> CFU/mL) and protected for 5.95 mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>), 10 minutes (3.9 mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>)) and 15 minutes (5.85 mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>)) to the disinfection process. The initial data were found from 10 minutes would be the time required to obtain the saturation of ozone in the water (2.7), therefore, this was defined for the sample of MAh in the SH to obtain the disinfection. The results of the sample collection after the analysis were not microbial created in all samples of samples of the analysis, being 15 of functioning in first sample of different samples; the second sample after 10 minutes of circulation of the ozonized water in the SH; the third sample after 5 minutes of circulation of the water ozonated by the HS, in the presence of the contaminated MAh; the fourth sample after 10 minutes of circulation of water ozonated by HS in the presence of contaminated MAh, the fifth sample after 15 minutes of circulation of water ozonated by HS, in the presence of contaminated MAh. The evolution of the surface of the MAh was performed with the aid of a reduction of minutes microbiological analysis after 5 days of disinfection there was a reduction of 1 Log of microbial growth, while after 10 and 15 there were 2 Log of microbial growth, indicating that microbial growth from 10 minutes and 15 minutes no microbial growth was detected. The morphological analysis and the discovery of the biomaterial system revealed that the structural structure of the MAh was maintained during the promissory process and revealed the use of disinfection of this. It is possible to deepen the behavior from the hydrodynamic system using ozonated water for the infection of the biological material, it was possible to promote a flow regime with transient, which favors the flow flow and the removal of the contaminant material from the MAh. MAh have great potential for use in transformation processes, can be used in regeneration processes, can be preserved and preserved in terms of use in medicine.

**Keywords:** Biomedical Engineering ozonized water, human amniotic membrane (hAM), disinfection of biological material, hydrodynamic system.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Camadas do âmnio.....	21
Figura 2- Coleta e Separação das Membranas Amnióticas.....	29
Figura 3- Lavagem abundante da MAh, membrana lavada e fixação na porta-amostra.....	30
Figura 4- Colocação da placa metálica com a MAh no tubo de vidro e placa metálica com a MAh imersa na água contendo Ozônio.....	31
Figura 5- Representação esquemática do sistema hidrodinâmico desenvolvido para desinfecção da MAh.....	33
Figura 6- Concentração de Ozônio (mg/L) dissolvido em água destilada versus tempo (minutos) utilizando o sistema hidrodinâmico desenvolvido para desinfecção da MAh.....	37
Figura 7- Representação do Log microbiano após diferentes tempos de desinfecção.....	39
Figura 8- Imagens histológicas das MAh coradas com HE.....	41
Figura 9- Imagens de MAh obtidas a partir da MEV.....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Coleta das amostras de água a partir da válvula de drenagem vide Figura 5 em diferentes momentos da análise microbiológica.....	34
Tabela 2- Determinação da presença ou ausência de crescimento microbiano a partir da análise da água em diferentes etapas do processo de desinfecção.	38
Tabela 3- Representação do número de colônia de bactérias presentes nas membranas amnióticas, com coleta de esfregaço por swab antes e depois da colonização.....	39
Tabela 4- Determinação da presença ou ausência de crescimento microbiano a partir da inoculação direta do fragmento da MAh após os diferentes tempos do processo de desinfecção.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM – Âmnio

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

b-FGF- *Basic Fibroblast Growth Factor*

BMT- Instrumento de Calibração de Ozônio

CEA- Células Estromais derivada de Adipócitos

CITÉ- Laboratório de Biotecnologia Centro de Inovação, Tecnologia e Educação

CK- Citoqueratinas

EDQM- European Directorate for the Quality of Medicines

EGF- *Epidermal Growth Factor*

HE- Hematoxilina e eosina

HFG- *Hepatocyte Growth Factor*

HGF- Liver Growth Fator

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA- Antígeno Leucitário Humano

KGF- *Keratinocyte Growth Factor*

KGy- Unidade de energia de radiação ionizante

Log – Logaritmo

MA - Membrana Amniótica

MAh - Membrana Amniótica humana

MAP- Membrana Amniótica Preservada

MEV- Microscopia eletrônica de Varredura

MO- Membranas Ovulares

NaCL- Cloreto de Sódio

O<sub>3</sub>- Ozônio

PA- Código Postal da Pensilvânia (EUA)

PCL- Eletroluminescentes de pólice prolactona

RDC- Resolução da Diretoria Colegiada

Re- Número de Reynolds

RPMO- Rotura Prematura das Membranas Ovulares

TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- *Transforming Growth Factors*

TIMP- Inibidores Teciduais de Metaloproteases

USA- Estados Unidos da América

VEJA 3 LMV- Modelo do microscópio eletrônico de varredura

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 OBJETIVOS .....	17
2.1. Objetivo Geral .....	17
2.2. Objetivos Específicos .....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	18
3.1 Engenharia de tecidos .....	18
3.2 Membrana amniótica Humana (MAh) .....	20
3.3 Contaminações presentes em tecidos biológicos .....	23
3.4 Método de esterilização de material biológicos .....	24
3.5 Método de desinfecção de material biológicos .....	25
3.6 Ozônio .....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
4.1 Coleta e transporte da Membrana Amniótica .....	29
4.2 Lavagem da MAh .....	30
4.3 Contaminação experimental das amostras .....	30
4.4 Protocolo para desinfecção das amostras de MAh .....	31
4.5 Análise microbiológica da água no sistema .....	34
4.6 Análise microbiológica da superfície dos fragmentos de MAh através de swab .....	35
4.7 Análise microbiológica direta dos fragmentos de MAh .....	35
4.8 Análise Histológica .....	35
4.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	36
5 RESULTADOS .....	37
5.1 - Determinação do regime de escoamento .....	37
5.2 Análise microbiológica da água empregada no dispositivo hidrodinâmico .....	38
5.3 Análise microbiológica da superfície das amostras de MAh através de swab .....	38
5.4 Análise microbiológica através da inoculação direta dos fragmentos de MAh .....	40
5.5 Análise Histológica .....	40
5.6 Análise da superfície da MAh através da MEV .....	42
6 DISCUSSÃO .....	43
7 CONCLUSÃO .....	49

REFERÊNCIAS.....51  
ANEXOS .....61

## 1 INTRODUÇÃO

Membrana Amniótica humana (MAh) é uma membrana delgada localizada no lado interno da placenta, que circunda completamente o embrião/feto e delimita a cavidade amniótica, sendo esta preenchida pelo líquido amniótico (POLLARD, AYE, SYMONDS, 1976; VAN HERENDAEL, OBERTI, BROSENS, 1978; MAMEDE et al., 2012). A MAh é formada por uma única camada de células epiteliais cuboidais, semelhantes as células da epiderme, que está ligada a uma espessa membrana basal e a uma matriz estromal avascular, composta por fibroblastos dispersos em uma estrutura de colágeno.

A presença de matriz extracelular rica em polímeros fibrosos constituídos principalmente de colágeno confere ao estroma propriedades anti-inflamatórias, decorrentes do aprisionamento de células inflamatórias, da inibição da atividade de proteases, diminuição da peroxidação lipídica e da presença de vários tipos de fatores de crescimento (*Epidermal Growth Factor* - EGF, *Basic Fibroblast Growth Factor* – b-FGF, *Hepatocyte Growth Factor* - HFG, *Keratinocyte Growth Factor* - KGF and *Transforming Growth Factors* - TGF) e citocinas (*Interleukin 6 and 8*). Além disso, a MAh tem outras propriedades biológicas, como efeito antimicrobiano e anti-fibrose, juntamente com a capacidade de diminuir cicatrizes, favorecer a neovascularização, a cicatrização de feridas e reduzir a dor (HAO et al., 2000; EDQM, 2017).

Devido as diversas propriedades biológicas, a MAh tem sido usada atualmente como um produto de base biológica muito promissor na prática clínica, especialmente na oftalmologia e no tratamento de uma ampla variedade de condições patológicas, como no manejo das queimaduras, como curativo temporário ou de longo prazo, como material de enxerto sobre úlceras de pele, em artroplastia e cirurgia reconstrutiva (EDQM, 2017; JIRSOVA; JONES, 2017; KHOSRAVIMELAL et al. 2020; KOLLER; ORSAG, 2006; MERMET et al., 2007).

A MAh é obtida a partir de parto cesária, sendo separada da placenta e na sequência processada para ser então armazenada (EDQM, 2017). Tehrani et al. (2020) descreveram que a preservação da membrana segue geralmente o protocolo proposto por Kim na qual a membrana é processada com antibióticos e antifúngicos e mantida em meio contendo glicerol a - 80°C (KIM; TSENG, 1995). No entanto, o método mais consagrado para processamento da MAh é a rádio esterilização, que

pode ser realizada por dois mecanismos principais: o acelerador de elétrons e as fontes de radiação Gama de cobalto 60 (SUN et al., 2020).

Os raios Gama contêm energia de fótons que possuem a capacidade de romper as cadeias de polipeptídeo, e através da radiólise das moléculas de água são liberados radicais livres que causam a quebra de ligações cruzadas de colágeno e o material não irradiado apresenta um epitélio e estruturas do tecido conjuntivo mais intacto quando comparados ao irradiado. Estas alterações estruturais podem dificultar seu uso, o que leva a ser considerado uma desvantagem do uso desta técnica (TZAPHLIDOU, 2002).

O Ozônio é uma forma alotrópica do oxigênio e um potente oxidante. Quando dissolvido na água reage com compostos orgânicos e é altamente indicado na degradação e eliminação de matéria orgânica e microrganismos (LIMA; FELIX; CALIRDOSO, 2021).

Com base nestas informações, o presente estudo avaliou o uso de um sistema hidrodinâmico que emprega água ozonizada para a desinfecção de MAh, além de verificar possíveis alterações morfológicas, a partir de análise histológica e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), induzidas pelo processamento deste biomaterial. Além disso, com o cálculo do número de Reynolds em termos da hidrodinâmica, foi possível estimar o regime da água corrente sobre o tecido biológico, laminar ou turbulento, a fim de manter a integridade do MAh, e permitir a remoção de material microbiano depositado sobre a superfície da amostra pela energia cinética das moléculas do fluido, enquanto o ozônio dissolvido na água exerça seu efeito microbicida.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Avaliar o uso do gás ozônio dissolvido na água através de um sistema hidrodinâmico para a desinfecção de MAh.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Determinar a concentração de ozônio dissolvido na água e a concentração de ozônio para cada tempo de exposição da MAh no processo hidrodinâmico;
- Realizar a análise microbiológica após o processo de desinfecção, através da análise da água, análise da superfície e análise direta do biomaterial;
- Realizar a análise comparativa dos diferentes tempos de ozonização do biomaterial com o intuito de definir o tempo mínimo necessário para realizar a desinfecção da MAh;
- Determinar o número de Reynolds em termos da hidrodinâmica com a finalidade de estimar o regime de escoamento da água corrente sobre o tecido biológico;
- Analisar possíveis alterações morfológicas decorrentes do processo de ozonização a partir de análise histológica;
- Analisar possíveis alterações na superfície da MAh por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) após o processo de ozonização.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Engenharia de tecidos

A Engenharia de tecidos está envolvida em desenvolver novos dispositivos, materiais e processos biocompatíveis com capacidade para interagir com o tecido biológico natural, servindo como estrutura reparadora e arcabouço para células capazes de serem aplicados ou instalados nos pacientes (NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016).

A terapia celular para o reparo de cartilagem articular tem sido bem explorada pela Engenharia de tecidos, adequando, células e moléculas sinalizadoras com biomateriais principalmente células-tronco mesenquimais do tecido adiposo pois possuem grande potencial de regeneração e facilidade na coleta (SILVA, 2017).

A Bioengenharia ou Engenharia de tecidos possibilita a construção de *bioscaffolds* a partir da matriz extracelular, podendo ser obtido em várias fontes teciduais alogênicas e xenogênicas, de diferentes espécies, podendo ser utilizado em cirurgias cardíacas e cirurgias oculares, como, por exemplo, de pericárdio que é um tecido rico em glicoproteínas, colágeno e glicosaminoglicanas (WOLLMANN et al., 2019)

Os vasos sanguíneos artificiais, criados pela Engenharia de tecidos, são relatados em estudos da área médica para utilização em microcirurgias pois são elaborados com tecnologia de nano celulose, atuando no processo de regeneração em feridas, diminuição da dor em tecidos queimados, promovendo a granulação e manutenção dos fatores de crescimento e permitindo incorporar substâncias ativas em suas estruturas para modulação específicas de algumas propriedades (FISCHER et al., 2017).

A Engenharia de tecidos vem observando e criando biomateriais como alternativa para utilização em arcabouços de tecido ósseo, com arquitetura tridimensional, porosa compatível com células ósseas, promovendo regeneração dando suporte para crescimento, proliferação e diferenciação celular, sendo que esses suportes devem apresentar resistência mecânica e protocolos que revelam biocompatibilidade (SILVA, 2017).

Os suportes criados pela Engenharia de tecidos combinam células-tronco e adultas com biomateriais que trazem novas perspectivas para as necessidades de

preenchimento ósseo. Previamente carregadas com células para osteo indução e angiogênese, na Engenharia de tecidos, utiliza-se células-tronco mesenquimais de tecido adiposo para compensar as dificuldades nas propriedades mecânicas de formas de tratamento convencional como os cimentos de hidroxiapatita e os fosfatos tricálcicos (CORSETTI, 2017).

Baseando-se na relação entre estrutura química dos biomateriais com as estruturas e propriedades dos tecidos ósseos, a Engenharia de tecidos vem aplicando os arcabouços com estruturas mecânicas semelhantes aos ossos naturais baseando-se na físico-química biológica para criar arcabouços utilizando polímeros sintéticos como o prolícaprolactona, ácido polilático, ácido poliglicólico associados a cerâmica bifásica, devido as suas propriedades porogênicas (ENCARNAÇÃO, 2016).

A Engenharia de tecidos estuda a biocompatibilidade, resistência mecânica e biodegradabilidade, dos *scaffolds*, bem como adesão e proliferação e preservação celular, adequando biomateriais como os hidrogéis pois apresentam boa compatibilidade com os tecidos a serem regenerados utilizando polímeros sintéticos ou naturais de acordo com a função e necessidade, uma vez que esses suportes irão acomodar células vivas (NOBRE, 2016).

O progresso e bom resultado das terapias envolvendo transplante celular são dependentes da Engenharia de tecidos, sendo essa área interdisciplinar que oferece alternativas regenerativas utilizando estruturas para crescimento celular fora do organismo e implantes de suportes biocompatíveis para induzir a formação de tecidos renovados, combinando fatores de crescimento, marcadores específicos com estimulação mecânica ou elétrica (MARTINS, 2018).

A Engenharia de tecidos com auxílio de ferramentas biológicas vem avançando cada vez mais no sentido de substituir órgãos danificados ou adoecidos por órgãos artificiais, combinando biologia molecular, biologia celular, ciência dos materiais, medicina e engenharia. Com o objetivo de enfrentar os desafios, a engenharia de tecidos está desenvolvendo formas para ter sucesso, pois milhares de pessoas morrem devido à falta de doador (PESSOA; SCHIRMER; ROSA, 2013). Neste sentido, a MAh apresenta diversas características que tornam seu uso muito promissor na engenharia de tecidos, como é o caso da sua flexibilidade, estabilidade e permeabilidade, sendo um tecido biocompatível e indicado para restaurar função comprometida por traumas, doenças inflamatórias e degenerativas e defeitos

congênitos para o campo da medicina regenerativa (GONÇALVES; SANT'ANNA, 2021).

### **3.2 Membrana amniótica Humana (MAh)**

As membranas amnióticas (MA) são chamadas de membranas ovulares (MO) segundo protocolo (RPMO) Rotura Prematura das Membranas Ovulares. Membrana ovular pode ser compreendida como a rotura espontânea da membrana amniótica após a 20<sup>o</sup> semana de gravidez e antes do início do trabalho de parto (GONÇALVES et al., 2019).

Os estudos de Hao et al. (2000) e EDQM (2017) afirmaram que histologicamente as membranas possuem citosinas tais como fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), citoqueratinas (CK) AE1/ AE3 e CK 19. Produz anti-angiogênico do tipo trombospondina-1 e endostatina e os inibidores teciduais de metaloproteases, (TIMP1, TIMP2, TIMP3 e TIMP4).

Soares (2013) descreve que a membrana amniótica é a camada interna das membranas fetais, muito utilizada em transplantes por ser um tecido rico em propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antifibróticas, com risco mínimo de provocar reações imunológicas.

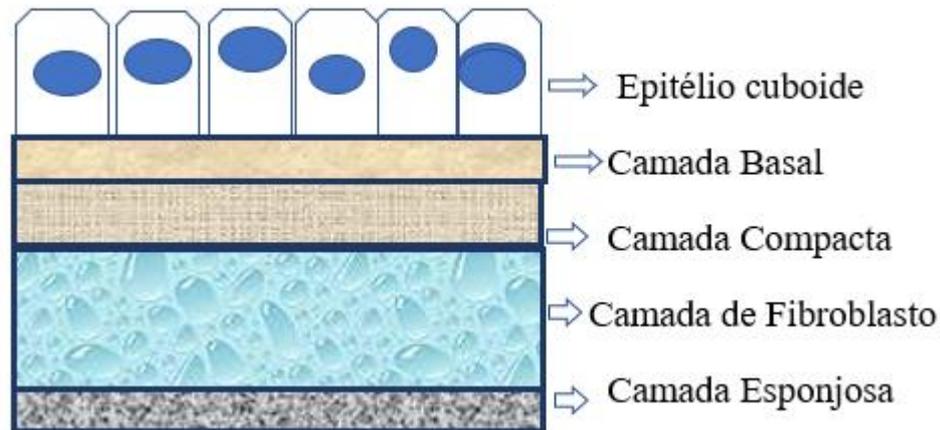
Duarte (2014) afirmou que a (AM) ou âmnio em sua estrutura histológica varia desde a concepção até o momento do parto, sendo resistente, lisa, flexível, delgada e brilhante.

A MAh possui espessura variada conforme a região, sendo que nas regiões centrais ela é mais espessa e suas regiões próximas as bordas menos espessas. O nível de transparência e índice de refração também são diferentes de acordo com a região (ALDROVANI; LAUS, 2015).

Duarte (2014) em seus estudos observaram que o âmnio é composto por uma camada epitelial, uma camada de membrana basal, uma camada compacta, uma camada de fibroblastos e uma camada intermediária. Essas camadas são formadas por colágeno e proteínas estruturais; juntos, eles fornecem a integridade mecânica da membrana.

A camada epitelial ou epitélio cuboide é formada por células cuboides e colunares com microvilosidades na superfície e núcleo bem definido (Figura 1). A

membrana basal é rica em estruturas compostas por laminina, fibronectina e colágeno tipo IV, VII e VIII essas estruturas são chamadas de filamentos de ancoragem (PAGGIARO, 2020). A camada compacta é aderida à camada basal e à camada de fibroblastos e possui colágeno do tipo I e III. A camada de fibroblasto como a compacta é rica em colágeno do tipo I e III e está ligada à camada esponjosa que é rica em mucina e está diretamente ligada ao corion (FERENCZY, 2020).



**Figura 1. Camadas do âmnio.**

Fonte: Próprio auto

A utilização da membrana amniótica como curativo biológico mostra um potencial de seus efeitos benéficos, a exemplo quando utilizada em queimaduras. Ao cobrir as terminações nervosas promove a diminuição da dor e seu efeito anti-inflamatório, devido a presença de interleucina 10 e metaloproteínas. Os fatores de crescimento promovem epitelização e angiogênese, além de impedir o ressecamento do tecido (GAVIRIA-CASTELLANOS; GOMEZ-ORTEGA; GERRERO-SERRANO, 2018).

Estudo realizado por Ramuta e Kreft (2018) confirmaram as vantagens e o potencial da MAh para uso em urologia regenerativa e reconstrutiva, apontando algumas considerações preocupantes em relação a falta de um protocolo padronizado na preparação e armazenamento de MAh. Sugeriram que houvesse uma padronização para preparar e armazenar, bem como mais estudos em animais maiores e ensaios clínicos, para avaliar o potencial do uso de MAh em pacientes urológicos.

O armazenamento da MAh em glicerol é o método mais utilizado no mundo. Esse método foi desenvolvido em 1984, nos países baixos, devido a necessidade de

preservar pele para serem doadas a transplante. Devido aos resultados bastante positivos, essa técnica obteve aceitação geral no âmbito clínico sendo utilizada também para armazenamento de MAh (FIRENCZY; SOUZA, 2020).

Parveen et al. (2019) em seus estudos com a MAh demonstraram na engenharia de tecidos cardíacos que foi possível usar a MAh como *scaffold* para cultivar cardiomiócitos humanos derivados de células-tronco. Além disso, verificaram os efeitos anti-inflamatórios e anti-fibrótico da MAh, assim ela foi classificada como um suporte compatível com o tecido cardíaco. O uso de MAh é promissor porque além de ser natural, biocompatível, também é de fácil obtenção e amplamente disponível.

Martinez Pizarro (2020) em seus estudos traz evidências de cicatrização de úlcera em pés diabéticos utilizando duas camadas de membranas, sendo que em três semanas o local da ferida cicatrizou.

Jirsova e Jones (2017) relatam em suas pesquisas a utilização de membrana amniótica em cirurgias oftálmicas, sendo uma rica fonte de células epiteliais e mesenquimais de grande utilidade na medicina regenerativa, aplicada nas áreas de dermatologia, cirurgia plástica e na área de genital.

Flügel, Girardi e Wasilewski (2021), em seus estudos, relataram a utilização de MAh em cirurgia de globo ocular, sendo que esta foi fixada através de fio de nylon e/ou cola biológica. Os resultados demonstraram uma melhora na maioria dos transplantes realizados, afirmando também que a MAh pode ser uma boa alternativa para transplante ocular.

Em seus estudos sobre o uso de MAh como curativo biológico em tratamento para queimados, Silva et al. (2019), descreveram várias vantagens como a prevenção de infecção, alívio da dor, aceleração da cicatrização e facilidade para aplicar, além de evitar a troca constante de curativos, diminuindo o estresse do paciente e do profissional de saúde.

Uma das principais vantagens de uso da MAh, sendo esta considerada uma propriedade muito exclusiva, é a de não induzir a rejeição após o transplante, pois ela não expressa os antígenos de histocompatibilidade HLA-A, B ou DR (MOREIRA; OLIVEIRA, 2000). Além disso, foram identificados Colágeno tipos I, III, IV, V e VII, Laminina e Fibronectina na membrana basal e no estroma, sendo Laminina e Fibronectina são especialmente eficazes na facilitação da adesão celular (EDQM, 2017).

Segundo Isaac et al. (2016), a MAh, como material biológico, possui propriedades benéficas no processo de reparação tecidual sendo utilizadas também como substrato para o cultivo de células epiteliais.

Hao et al. (2000) e EDQM (2017) relataram que a MAh quando preservada é considerada como um tecido inerte com células inviáveis. A capacidade reparadora das membranas em preservação influencia na reparação da lesão através dos fatores de crescimento e citocinas que podem estar limitados ou inexistentes bem como a presença de vários fatores de crescimento no epitélio da membrana, como (Epidermal Growth Factor - EGF), Transforming Growth Factor -TGF), B1, B2, B3, (Keratinocyte Growth Factor - KGF), (Fibroblas Growth Fator - b-FGF) e (Liver Growth Fator - HGF), facilitando a migração celular.

Iranpour et al. (2018) demonstraram os efeitos estimulantes do crescimento de MAh, assim como seu aumento da resistência mecânica após o cultivo de células estromais derivada de adipócitos (CEA), e de falta de imunogenicidade, sendo um modelo seguro para a entrega de células halogênicas e aplicações de engenharia de tecidos.

Paolin et al. (2017) relataram que os principais motivos de descarte desse material biológico são aqueles relacionados à contaminação microbiana principalmente por bactérias. Esta seria talvez a única desvantagem em sua utilização quando utilizada sem o devido preparo.

### **3.3 Contaminações presentes em tecidos biológicos**

Artigo publicado por banco de tecidos biológicos do Brasil descreve que os principais motivos de descarte desse material biológico estão relacionados à contaminação microbiana principalmente por bactérias (STEFFEN, 2018).

Em análise microbiológica de feridas complexas como úlcera por pressão, lesões vasculares diabéticas e síndrome de Fournier, identificou-se 22 espécies de bactérias, sendo 18 Gram – negativas e 4 Gram – positiva, com predomínio de *Pseudomonas aeruginosas*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* (OLIVEIRA et al., 2021).

Também na pesquisa realizada com pacientes portadores de feridas entre 2 meses a 3 anos, sendo a maioria portadores de feridas na região do maléolo a mais de 1 ano, revelou a presença de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*,

*Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*,, com predomínio de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* (BORGES; AORIN; CARVALHO, 2014).

### **3.4 Método de esterilização de material biológicos**

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução RDC nº 512, de 27 de maio de 2021 determina que esterilização é a eliminação total ou inviabilização de todos os microrganismos, incluindo os esporos, por meio de processo físico ou químicos.

Segundo Paggiaro (2010) apesar do glicerol ter efeito desinfetante, a maior parte dos bancos de tecido do mundo exige que a MAh seja submetida a técnicas de esterilização. O tecido é considerado completamente estéril quando submetido a um processo complementar de esterilização. Atualmente, o mais consagrado na literatura é a rádio esterilização, que pode ser realizada por dois mecanismos principais: o acelerador de elétrons e as fontes de radiação Gama de cobalto 60.

A radiação Gama tem alta capacidade em eliminar bactérias, fungos, vírus e esporos, mas em contrapartida altera as características e as propriedades dos tecidos biológicos (FERENCZY,2020). A radiação interage com a molécula de DNA podendo causar mutação genética ou morte celular, ou quebrando a molécula de água formando radicais livres (OKUNO, 2013).

Os raios Gama contêm energia de fótons que possuem a capacidade de romper as cadeias de polipeptídeo, e através da radiólise das moléculas de água são liberados radicais livres que causam a quebra de ligações cruzadas de colágeno e o material não irradiado que apresenta um epitélio e estruturas do tecido conjuntivo mais intacto quando comparados ao irradiado (DIAS, 2018). Estas alterações estruturais podem gerar resultados clínicos menos favoráveis, o que pode ser considerado uma desvantagem do uso desta técnica (TZAPHLIDOU, 2002).

Seitz et al. (2018) relataram que a MAh após ser processada em condições estéreis e seca ao ar durante a noite em capela de fluxo laminar, deverá ser embalada e esterilizada por irradiação, sendo que este procedimento de desidratação poderá alterar algumas propriedades do âmnio.

Os estudos com raios Gama a 25 KGy quando aplicados como método de esterilização em tecidos biológicos, como em membrana amniótica, evidenciou a danificação nas estruturas das membranas (PAGGIARO et al.,2020).

### 3.5 Método de desinfecção de material biológicos

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução RDC nº 512, de 27 de maio de 2021, desinfecção é o processo físico ou químico, que destrói ou inativa a maioria dos microrganismos patogênicos de objetos inanimados e superfícies, com exceção de esporos bacterianos.

Técnicas de desinfecção de tecidos biológicos utilizando Dodecil sulfato de sódio (DSS) tendem a alterar as características dos tecidos e biomateriais (SUN et al., 2020).

A Clorexidina ou Digluconato de Clorexidine, embora seja uma substância com excelente ação bactericida, bastante utilizada na odontologia por sua ação contra *Streptococcus mutans*, agindo na destruição das membranas citoplasmáticas das bactérias, ela não é eficaz contra os esporos. (KLUK et al., 2016).

Estudos na área de odontologia avaliando os efeitos da clorexidina a 12% aplicado na cavidade oral para antissepsia, demonstraram alguns efeitos colaterais como queimadura do tecido mole, perda do paladar e alteração na coloração do material dentário (PEGORARO, 2015).

Obtida de parto cesária, a membrana amniótica é separada da placenta podendo ser usada preservada. Souza et al. (2004) descreveram que a preservação da membrana segue, na maioria das publicações, o protocolo proposto por Kim, precursora nessa linha pesquisa, no qual a membrana é preparada com antibióticos e antifúngicos e é mantida em meio contendo antibióticos e glicerol a - 80° C (KIM; TSENG, 1995).

O armazenamento em glicerol é o método mais utilizado no mundo. Esse método foi desenvolvido em 1984 nos países baixos devido a necessidade de preservar pele para serem doadas a transplante. Devido aos resultados bastante positivos e o baixo custo, essa técnica obteve aceitação geral no âmbito clínico sendo utilizada também para armazenamento de MAh (FIRENCZY; SOUZA, 2020).

Seitz e Huckzermeyer (2018) relataram que a MAh, durante o processamento, deve ser incubada durante 12 horas em solução antibiótica de amplo espectro, contendo um antifúngico, e, após congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , poderá ser utilizada no tratamento de feridas.

### 3.6 Ozônio

O ozônio é um gás incolor de odor forte, instável e parcialmente solúvel em água. Sendo um importante desinfetante, já que exerce sua ação em diferentes organismos patogênicos incluindo bactérias, vírus e protozoários. A ação germicida deste gás foi relatada na França a partir de sua utilização no final do século XIX, quando foi utilizado como desinfetante para tratamento da água. Além disso, o ozônio vem sendo empregada na terapêutica, denominado como Ozonioterapia (BOCCI, 2005).

O ozônio ( $\text{O}_3$ ) pode ser considerado o mais potente germicida natural, sendo capaz de eliminar vírus, bactérias, protozoários e fungos com alta eficiência e rapidez, devido a sua atividade altamente oxidante (RICKLOFF, 1987; BOCCI et al., 1998; BOCCI, 2005; MOAT et al., 2009). O ozônio é produzido naturalmente na atmosfera pela ação fotoquímica dos raios ultravioleta sobre as moléculas de oxigênio, e também pode ser produzido artificialmente. Tal elemento é constituído estruturalmente por três átomos de oxigênio e possui meia vida de aproximadamente 40 minutos em temperatura ambiente (MOAT et al., 2009) e altamente solúvel em água e extremamente oxidativo. Esta última característica, combinada com a sua solubilidade, faz dele um excelente candidato para uso como desinfetante e esterilizante (BOTELHO; ALMEIDA, 2018).

Esse elemento, composto por três átomos de Oxigênio ( $\text{O}_2$ ), está presente na estratosfera e se comporta como filtro dos raios ultravioleta emitidos pela radiação solar. Maidana, Kreutz e Bernardi (2014). Com sua ação bactericida e desinfetante ele purifica o ar atmosférico, com a vantagem de ser um agente oxidante que não produz resíduos nocivos como subproduto, ao contrário produz Oxigênio (SCASSELLATI et al., 2020).

Souza (2016) também afirmou que além de suas propriedades esterilizantes têm baixo custo utilizando o oxigênio como insumo natural e pode ser aplicado em materiais termo sensíveis. Também sendo utilizadas para descontaminar salas

hospitalares bem como dispositivos médicos de aço inoxidável e poliméricos, na esterilização de garrafas, água e esgoto.

Segundo Silva et al. (2021) devido à sua elevada capacidade oxidativa, o Ozônio também está sendo utilizado na área de odontologia pois destrói bactérias, vírus, esporos, endotoxinas e biofilmes. Afeta a membrana citoplasmática e sistemas enzimáticos, determinando a lise de células e inibindo o desenvolvimento de resistência bacteriana.

Redigueri et al. (2017) avaliaram a adequação do ozônio gasoso na esterilização de *scaffolds* eletroluminescentes de policaprolactona (PCL), um polímero amplamente utilizado em engenharia de tecidos e em aplicações de medicina regenerativa. O ozônio foi eficiente na esterilização e preservou as características iniciais das estruturas com apenas a observação de um enfraquecimento dos *scaffolds* embora eles continuassem adequados e fortes o suficiente para serem utilizados como suporte na engenharia de tecidos. Além disso, verificaram que o ozônio induziu o aumento da proliferação de fibroblastos L929, sugerindo assim que a aplicação do gás ozônio pode ser uma técnica adequada para a esterilização de polímero *scaffolds*, que são sensíveis a outros métodos de esterilização.

Pessoa, Schirmer e Roza (2013) verificaram que o ozônio foi eficiente na eliminação de cistos de *Giardia spp* presentes em água residuária, além disso notaram que este processo é dose dependente.

Jacinto et al. (2014) observaram em seus estudos que o Ozônio utilizado para desinfecção de água de reuso, como método alternativo para substituir o cloro, é seguro para a saúde e para o meio ambiente pois não resulta em subprodutos, bem como demonstram que estão dentro das especificações da legislação atual com relação às análises microbiológicas.

O ozônio dissolvido em água é uma excelente promissora opção com maior eficácia que o hipoclorito no controle de microrganismos, na desinfestação e desinfecção de superfícies e alimentos, pois possui uma forte ação contra bactérias, cistos de protozoários, vírus, fungos e esporos de fungos (MAXIMIANO, 2017).

No presente estudo foi desenvolvido um protótipo empregando água ozonizada como desinfetante devido sua eficácia na desinfecção de superfícies e alimentos (FONSECA et al. 2020). Simultaneamente, ocorre a atuação de um sistema hidrodinâmico, funcionando através de um circuito hidráulico fechado, utilizando um reservatório e uma bomba d'água, associado a uma válvula do tipo Venturi para a

inserção do gás ozônio. Dessa forma, o arrasto da água ozonizada sobre as superfícies do tecido biológico alvo, produzindo assim, a remoção de material orgânico pertinente, principalmente a microbiota instalada. Cálculos envolvendo a obtenção do número de Reynolds utilizados em hidráulica, permitiram verificar o modo de atuação hidrodinâmica da água ozonizada sobre as superfícies da MAh, constatando dessa maneira a formação de uma dinâmica laminar ou turbulento sobre o tecido biológico alvo (VASQUES; MENEGASSO; SOUZA, 2016).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

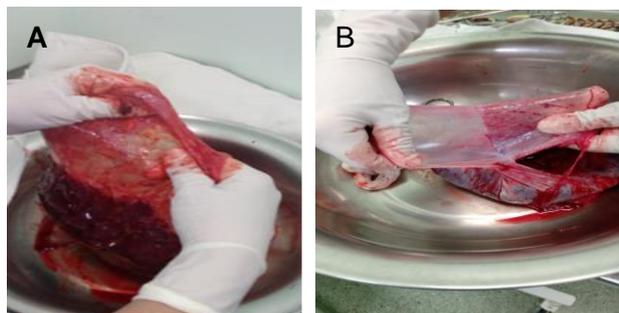
O presente estudo foi realizado mediante a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com o parecer nº 2.829.910. As MAh foram coletadas na Santa Casa de Misericórdia de Pindamonhangaba/SP/Brasil, conforme determina as Normas Técnicas para o funcionamento dos bancos de sangue de cordão umbilical e placentário segundo a Resolução - RDC nº 190/ 2003 (ANVISA, 2003). As oito voluntárias que aceitaram doar a MAh para o presente estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Membranas amnióticas frescas foram obtidas assepticamente a partir de cesarianas de doadoras soronegativas (sífilis, hepatite B, toxoplasmose, HIV) com intervalo de idade entre 28 a 30 anos.

### 4.1 Coleta e transporte da Membrana Amniótica

O material foi colhido na Santa Casa de Misericórdia de Pindamonhangaba após a autorização dos responsáveis técnicos dessa instituição.

O material biológico foi coletado conforme determina as Normas Técnicas para o funcionamento dos bancos de sangue de cordão umbilical e placentário segundo a Resolução - RDC nº 190, de 18 de julho de 2003.

A figura 2 demonstra a obtenção e separação da MAh. Na sequência o material foi acondicionado em um recipiente de vidro imerso em solução fisiológica (NaCl 0,9 %) e o recipiente contendo o material e esta solução foram acondicionados em um recipiente térmico refrigerado a uma temperatura de 10 a 15°C e transportado ao Laboratório de Biotecnologia do Centro de Inovação, Tecnologia e Educação – CITÉ, em São José dos Campos:

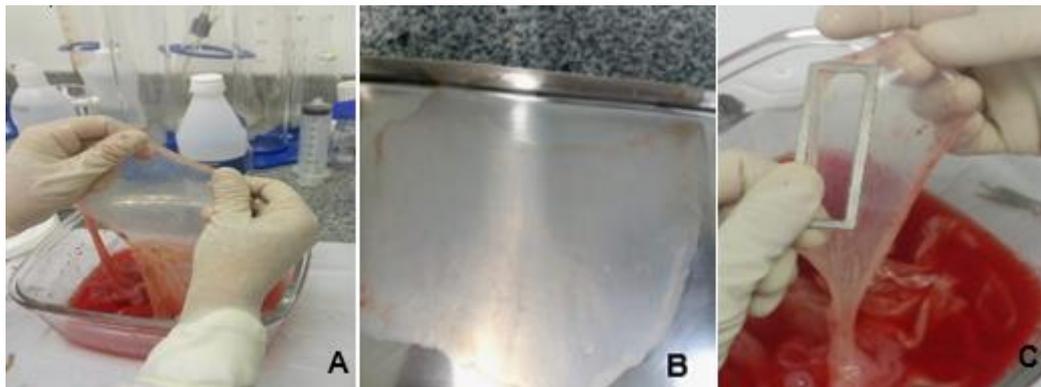


**Figura 2. Coleta (A) e separação das membranas amnióticas (B)**

Fonte: Próprio Autor

## 4.2 Lavagem da MAh

As MAh foram lavadas manualmente por 10 vezes com solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril para remoção dos resíduos biológicos (Figura 3), tais como sangue e líquido amniótico, e na sequência foram segmentadas e fixadas com adesivo à base de cianoacrilato em um porta-amostra retangular confeccionada em chapa de aço inoxidável (Figura 3 - C).



**Figura 3. Lavagem abundante da MAh (A), e membrana lavada (B) e fixação na porta-amostra (C)**

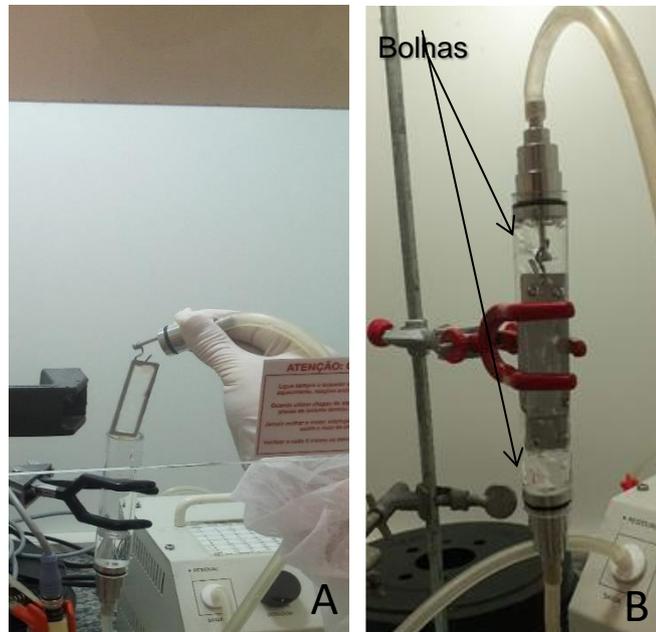
Fonte: Próprio Autor

## 4.3 Contaminação experimental das amostras

As amostras de MAh após o processo de lavagem foram cortadas com lâmina estéril de bisturi em fragmentos de aproximadamente 2cm de largura e 5cm de comprimento, para serem inseridas no porta-amostra, este confeccionado em chapa de aço inoxidável pelo laboratório de Engenharia de Materiais da CITÉ.

Após o acondicionamento da MAh no porta-amostra, essa foi submetida a contaminação experimental. A cepa de *Staphylococcus aureus* (CCCD S013) foi cultivada por 18-24 horas à 37°C, em Agar Mueller Hinton (HiMedia Laboratories, Pennsylvania, PA, USA) e foram empregadas para o preparo das suspensões microbianas. A concentração final de *S. aureus* foi ajustada em  $10^3$  UFC/mL, em solução fisiológica estéril, a partir de diluição seriada baseada em método nefelométrico (Escala de Mc Farland). O porta-amostra contendo o fragmento da MAh foi inserido em um tubo Falcon de 50 mL, onde o inóculo bacteriano foi também mantido em estufa à 37°C por 60 minutos.

Após esse período, a placa metálica contendo o fragmento com a MAh foi colocada dentro de um tubo de vidro com diâmetro de 22mm (2,2 cm) para ter contato com a água ozonizada (Figura 4).



**Figura 4. (A) Colocação da placa metálica com a MAh no tubo de vidro. (B) placa metálica com a MAh imersa na água contendo ozônio**

Fonte: Próprio Autor

#### 4.4 Protocolo para desinfecção das amostras de MAh

O sistema hidrodinâmico desenvolvido no presente estudo, qual foi solicitado o pedido de patente RPI 2666 (21) 10 2021 025.690-7, compreende em suas partes materiais que apresentam significativa resistência oxidativa ao ozônio, como por exemplo reservatório d'água de aço inoxidável (1 litro), dutos flexíveis de silicone para fluir a água ozonizada, bomba d'água e válvula Venturi de resina também resistente a oxidação perante ao ozônio. As partes constituintes do sistema, com exceção da bomba d'água e válvula Venturi, foram submetidas a desinfecção de alto nível em auto-clave a vapor. Os experimentos sempre foram conduzidos no interior de capela de exaustão com vistas a segurança do operador pela utilização do ozônio. Após o procedimento para contaminação das amostras, o porta-amostra contendo o fragmento da hAM foi posicionado dentro de um tubo de vidro com diâmetro interno

de 2,2 cm e comprimento de 12 cm, e então inserido no sistema desenvolvido baseado em um circuito hidrodinâmico fechado para a transferência de ozônio à água.

O sistema operava previamente por 10 minutos para atingir um valor de concentração de ozônio (mg/L) na água destilada, no intuito principalmente de inativar a potencial microbiota presente junto ao sistema hidráulico.

Além disso, foi coletado a cada 60 segundos, o valor de concentração de ozônio na água destilada durante o processo de ozonização, até o décimo quinto minuto. Para isso, foi utilizado o instrumento medidor baseado em amperometria potenciostática (TIZ-OEM, Anseros Klaus Nonnenmacher GmbH, Germany).

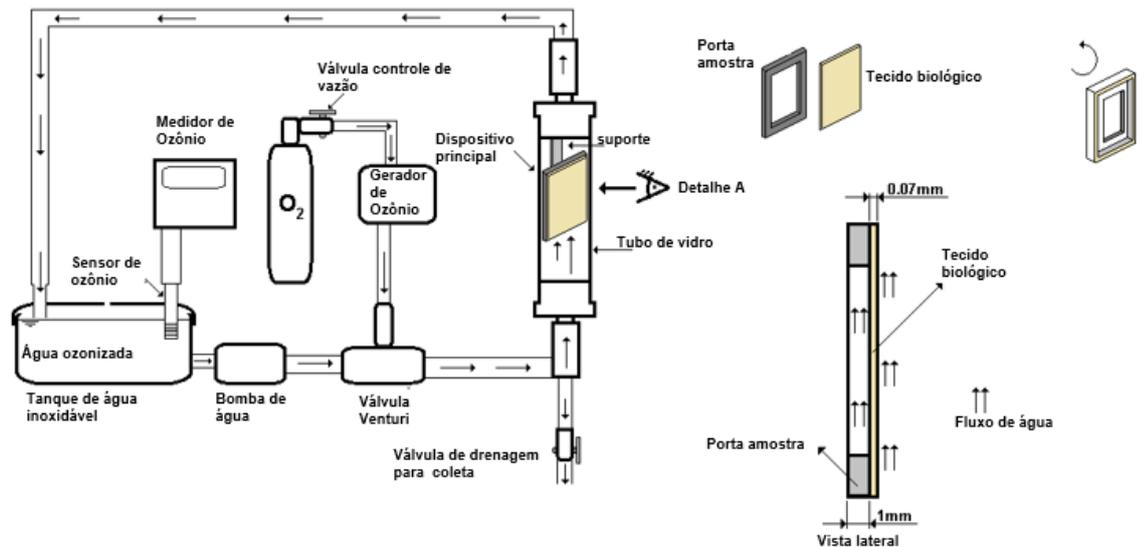
O gerador de ozônio (MS3G, MS Ltda, Brazil) foi ajustado a uma concentração de 62 mg/L, com taxa de fornecimento de gás oxigênio na entrada no valor de 0.125 L/min. Anteriormente, este gerador foi submetido a um protocolo de calibração, utilizando o instrumento medidor fotométrico para concentração de ozônio gasoso (BMT 964 ST, BMT GmbH, Germany).

O cilindro de oxigênio medicinal foi acoplado ao gerador de ozônio, o qual foi conectado a uma válvula Venturi de 1/8" responsável pela transferência de massa do ozônio para o fluxo de água pertinente ao sistema para desinfecção. O experimento foi realizado em ambiente devidamente climatizado com temperatura de 20°C. A medição térmica da água também foi monitorada durante o procedimento, indicando o mesmo valor de temperatura.

A água ozonizada foi continuamente bombeada por uma bomba do tipo centrífuga operando a uma vazão de 35 mL/s, que seguia por um circuito de mangueiras de silicone atóxico até o tubo de vidro que contém o porta-amostra da MAh. Na saída do cabeçote, a água ozonizada retorna para um reservatório em aço inoxidável com capacidade de 1 L, que contém a sonda para o monitoramento da concentração de ozônio dissolvido e da temperatura do fluido.

Com isso, a água ozonizada foi bombeada continuamente para a válvula Venturi e o ciclo do processo para desinfecção acontece continuamente, conforme ilustra a Figura 2. Todo o processo ocorre em um sistema hidrodinâmico fechado, automatizado e com um fluxo contínuo de água ozonizada escoando por toda a superfície da amostra biológica. Foram utilizados para análise três momentos durante o protocolo de desinfecção: 5, 10 e 15 minutos, nas respectivas dosagens de 1,95 mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>), 3,9 mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>), 5,85 mg/cm<sup>2</sup> O<sub>3</sub>).

Um detalhe relevante a ressaltar, é que a partir do ajuste de vazão (Q) da bomba d'água estabelecido para um valor de 35 cm<sup>3</sup>/s (ml/s), e uma vez que o diâmetro interno do tubo de vidro apresentou valor de 2,2cm, pode-se calcular a velocidade média (V) da água neste duto a partir da equação  $Q = A.V$ , onde A é considerada a área da secção transversal do tubo de vidro mostrado na Figura 5.



**Figura 5. Representação esquemática do sistema hidrodinâmico desenvolvido para desinfecção da MAh** (O detalhe A é uma vista lateral indicando tanto o porta-amostra, como também o tecido biológico, as setas indicam o movimento da água corrente atuando nas duas superfícies do MAh. A válvula de drenagem foi utilizada para a coleta de água a fim de permitir a avaliação microbiológica quantitativa).

Fonte: Próprio Autor

Levando-se em consideração os dados apresentados acima, foi possível mensurar a taxa de produção de ozônio para cada tempo de exposição, e a partir daí, determinar a quantidade em massa (mg) de O<sub>3</sub> entregue e as dosagens de O<sub>3</sub> aplicadas por cm<sup>2</sup> (mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>)).

### Taxa de produção de ozônio TO<sub>3</sub>

$$\begin{aligned} \text{TO}_3 [\text{mg}/\text{min}] &= C [\text{mg}/\text{L}] \times Q [\text{L}/\text{min}] \\ \text{TO}_3 &= 62 \text{mg}/\text{L} \times 0,125 \text{ L}/\text{min} \\ \text{TO}_3 &= 7,8 \text{ mg}/\text{min} \end{aligned}$$

### Quantidade de massa de O<sub>3</sub> entregue (mg)

Massa de O<sub>3</sub> = TO<sub>3</sub> x tempo (min)

$$7,8 \times 5 = 39 \text{ mg}$$

$$7,8 \times 10 = 78 \text{ mg}$$

$$7,8 \times 15 = 117 \text{ mg}$$

### Dosagem de O<sub>3</sub> aplicada por cm<sup>2</sup> [mg/cm<sup>2</sup>] = m O<sub>3</sub> / A

A [cm<sup>2</sup>] = Área da amostra = 20 cm<sup>2</sup> (5x10, considerando os dois lados)

$$5 \text{ min} = 39 \text{ mg}/20\text{cm}^2 = 1,95 \text{ mg/cm}^2 \text{ (O}_3\text{)}$$

$$10 \text{ min} = 78 \text{ mg}/20\text{cm}^2 = 3,9 \text{ mg/cm}^2 \text{ (O}_3\text{)}$$

$$15 \text{ min} = 117 \text{ mg}/20\text{cm}^2 = 5,85 \text{ mg/cm}^2 \text{ (O}_3\text{)}$$

#### 4.5 Análise microbiológica da água no sistema

Foram coletados, em triplicata, 0,1 mL de água a partir da válvula de drenagem (Figura 5), e semeadas em superfície, em meio de cultura Agar Mueller Hinton (HiMedia Laboratories, Pennsylvania, PA, USA). As placas de cultura foram mantidas em estufa à 37°C por 7 dias. A Tabela 1 descreve em qual momento as amostras de água foram coletadas do reservatório d'água do protótipo para análise microbiológica:

**Tabela 1. Coleta das amostras de água a partir da válvula de drenagem vide Figura 5, em diferentes momentos para análise microbiológica.**

Grupos	Descrição
<b>Grupo 1</b>	Coleta após 1 minuto de circulação da água pelo circuito hidrodinâmico, na ausência do O <sub>3</sub> e da MAh contaminada.
<b>Grupo 2</b>	Coleta após 10 minutos de circulação da água pelo circuito hidrodinâmico, com O <sub>3</sub> e na ausência da MAh contaminada.
<b>Grupo 3</b>	Coleta após 5 minutos de circulação da água pelo circuito hidrodinâmico, com O <sub>3</sub> e na presença da MAh contaminada.
<b>Grupo 4</b>	Coleta após 10 minutos de circulação da água pelo circuito hidrodinâmico, com O <sub>3</sub> e na presença da MAh contaminada.
<b>Grupo 5</b>	Coleta após 15 minutos de circulação da água pelo circuito hidrodinâmico, com O <sub>3</sub> e na presença da MAh contaminada

Fonte: Próprio Autor

#### **4.6 Análise microbiológica da superfície dos fragmentos de MAh através de swab**

Foram coletadas, em triplicata, através de swabs estéreis amostras da superfície da MAh delimitadas em 1 cm<sup>2</sup> para análise microbiológica. As amostras foram coletadas logo após a contaminação das MAh e após os diferentes tempos para desinfecção, 5 minutos (1,95 mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>)), 10 minutos (3,9mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>)) e 15 minutos (5,85mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>)).

As amostras foram semeadas em meio Agar Mueller Hinton (HiMedia Laboratories, Pennsylvania, PA, USA) e as placas foram mantidas em estufa à 37°C por 48 horas para leitura. Na ausência de crescimento as placas foram mantidas por mais 5 dias (totalizando 7 dias).

#### **4.7 Análise microbiológica direta dos fragmentos de MAh**

Fragmentos da MAh foram selecionados para serem inoculados diretamente na superfície do meio Agar Mueller Hinton (HiMedia Laboratories, Pennsylvania, PA, USA) com intuito de verificar crescimento microbiano no material. As placas foram mantidas em estufa à 37°C por 48 horas para leitura. Na ausência de crescimento as placas foram mantidas por mais 5 dias (totalizando 7 dias).

Fragmentos de MAh foram coletadas *in natura* e após a contaminação experimental. Além disso, foram semeados fragmentos após os diferentes tempos de desinfecção de 5, 10 e 15 minutos.

#### **4.8 Análise Histológica**

As amostras foram fixadas com solução de formol 10% e em seguida passaram pelos processos para desidratação, diafanização, impregnação e inclusão da amostra em bloco de parafina. O material foi cortado por micrótomo rotativo e corado com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram visualizadas em um microscópio óptico (TNB-01T, Anatomic, Brazil) e as imagens obtidas a partir de software TCCapture®

#### 4.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A fixação das amostras biológicas após as diferentes etapas de desinfecção foi realizada por imersão, imediatamente após a coleta.

As amostras de MAh foram analisadas por MEV, para tal foi empregada uma solução fixadora contendo glutaraldeído 25% em tampão fosfato 0,2 M e água destilada. Após a fixação, as amostras foram mantidas de 2 a 8 °C, sendo que o tempo mínimo de fixação foi de uma semana.

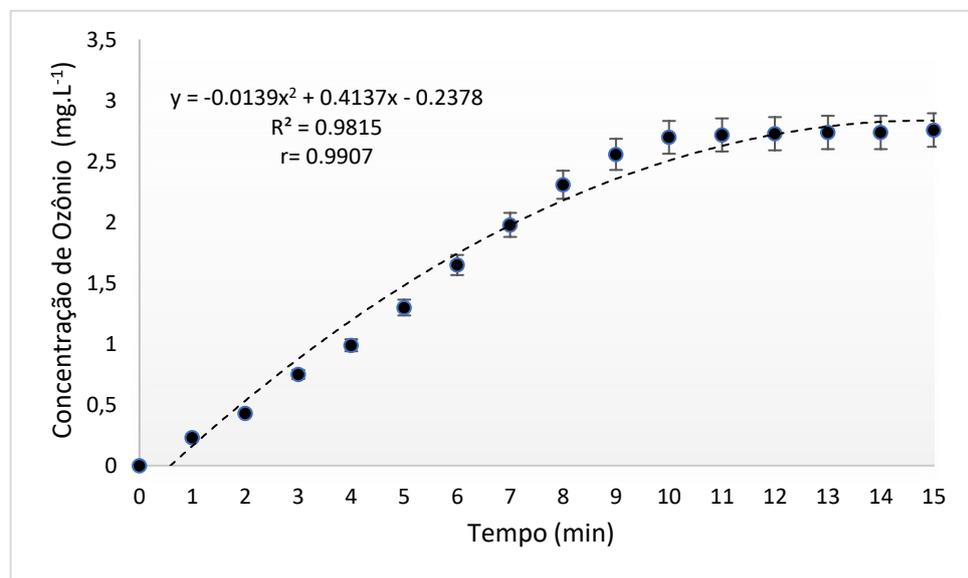
Após esta etapa, o material passou por 3 lavagens de 30 minutos cada, empregando-se uma solução de tampão fosfato 0,2 M e água destilada na proporção 1:1. A etapa seguinte foi a de desidratação, que foi realizada na sequência: álcool 30% durante 10 minutos; álcool 50% durante 10 minutos; álcool 70% durante 10 minutos; álcool 90% durante 10 minutos; álcool 90% durante 20 minutos; álcool 100% durante 10 minutos e álcool 100% durante 20 minutos.

Após a desidratação o material foi metalizado por uma metalizadora da marca Denton Vacuum Desk II com o intuito de tornar o material condutivo por meio de deposição de um metal, no caso ouro, sobre a amostra.

As amostras foram montadas sobre *stubs*, identificadas e acondicionadas em caixa apropriada para visualização no microscópio eletrônico de varredura modelo VEJA 3 LMU, marca Tecsan.

## 5 RESULTADOS

A Figura 6 apresenta os dados referentes a concentração de ozônio (mg/L) dissolvido na água destilada ao longo do tempo (min). Os resultados demonstram uma alta correlação, com  $r = 0.9907$  sob ajuste da equação polinomial. Além disso, baseando-se nesta curva foi possível determinar que a partir de 10 minutos seria o tempo necessário para obter a saturação de ozônio dissolvido na água (2.7 mg/L), por isso, este tempo inicial foi definido para inserir as amostras de MAh no sistema para a desinfecção.



**Figura 6. Concentração de ozônio (mg/L) dissolvido em água destilada versus tempo (minutos) utilizando o sistema hidrodinâmico desenvolvido para desinfecção de MAh.**

Fonte: Próprio Autor

### 5.1 - Determinação do regime de escoamento

O regime de escoamento de um fluido é obtido através do número de Reynolds (Re), número adimensional que define a relação entre as forças de inércia e as forças de viscosidade em uma tubulação ou em uma superfície.

Por definição,  $Re < 2000$  representa Escoamento laminar;  $Re$  entre 2000 e 2400 – Escoamento de transição; e  $Re > 2400$  – Escoamento turbulento (Martins, 2015). De acordo com a determinação do número de Reynolds pode-se definir o tipo de escoamento.

$$\text{Onde } Re = \frac{\rho \cdot v \cdot D}{\mu}$$

Re = Número de Reynolds

$\rho$ = densidade do fluido (água)	$\rho = 1,000 \text{ Kg/m}^3$
$\mu$ = viscosidade dinâmica do fluido (água)	$\mu = 1.003 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$
$v$ = velocidade média do fluido	$v = 9.2 \text{ cm/s} = 0.092 \text{ m/s}$
$D$ = diâmetro da tubulação	$D = 2,2 \text{ cm} = 0.022 \text{ m}$

$$Re = \frac{1000 \times 0.092 \times 0.022}{1.0030 \times 0,001}$$

Re = 2017

## 5.2 Análise microbiológica da água empregada no dispositivo hidrodinâmico

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, pode se verificar ausência de crescimento microbiano na água em diferentes etapas do processo de desinfecção, sendo que todo o material empregado no sistema foi previamente esterilizado.

**Tabela 2. Determinação da presença ou ausência de crescimento microbiano a partir da análise da água em diferentes etapas do processo de desinfecção.**

Amostras	24 horas	48 horas	7 dias
<b>Grupo 1</b>	0*/12**	0*/12**	0*/12**
<b>Grupo 2</b>	0*/12**	0*/12**	0*/12**
<b>Grupo 3</b>	0*/12**	0*/12**	0*/12**
<b>Grupo 4</b>	0*/12**	0*/12**	0*/12**
<b>Grupo 5</b>	0*/12**	0*/12**	0*/12**

Fonte: Próprio Autor

\*representação do número de amostras com crescimento microbiano /\*\*representação total de 12 amostras; MAh = Membrana Amniótica humana

## 5.3 Análise microbiológica da superfície das amostras de MAh através de swab

A tabela 2 apresenta a contagem microbiana obtida a partir da coleta de amostras empregando-se um swab estéril (UFC/cm<sup>2</sup>) na superfície das amostras de MAh contaminadas experimentalmente e após o procedimento de desinfecção (5, 10

e 15 minutos), nas respectivas dosagens, 1,95mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>), 3,9mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>) e 5,85mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>).

Os dados obtidos demonstraram que após 5 minutos de desinfecção houve uma redução microbiana de aproximadamente 48 %, enquanto, após 10 e 15 minutos não houve crescimento microbiano.

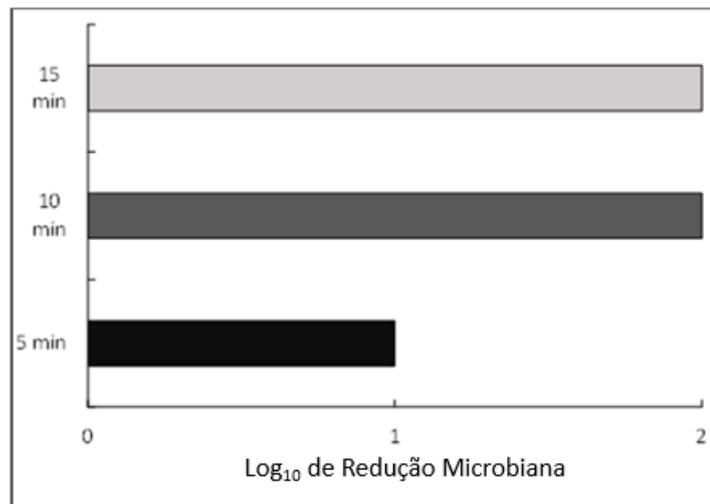
**Tabela 3. Representação do número de colônias de bactérias presentes nas membranas amnióticas, com coleta de esfregaço por swab antes e depois da ozonização.**

Tempo (minutos)	Contagem microbiana das amostras antes da contaminação experimental (UFC/cm <sup>2</sup> )	Contagem microbiana das amostras após processo de desinfecção (UFC/cm <sup>2</sup> )
5	191 (±31)	92 (±27)
10	175 (±24)	A/C*
15	197 (±30)	A/C*

Fonte: Próprio Autor

\*A/C=Ausência de crescimento

A figura 7 representa o Log de redução microbiano após os diferentes tempos do processo de desinfecção. Após 5 minutos de desinfecção houve a redução de 1 Log, enquanto que após 10 e 15 minutos foram 2 Log de redução microbiano.



**Figura 7. Representa o Log de redução microbiano após os diferentes tempos de desinfecção na dosagem de 1,95mg/cm<sup>2</sup> de (O<sub>3</sub>) para 5 minutos, 3,9mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>) para 10 minutos e 5,85mg/cm<sup>2</sup> (O<sub>3</sub>) para 15 minutos.**

Fonte: Próprio Autor

#### 5.4 Análise microbiológica através da inoculação direta dos fragmentos de MAh

A tabela 4 apresenta os dados referentes a análise microbiológica direta da inoculação dos fragmentos de MAh após os três diferentes tempos de desinfecção. Os resultados demonstraram que após 5 minutos de desinfecção as amostras apresentavam crescimento microbiano, em contrapartida, a partir de 10 minutos não foi detectado crescimento microbiano, nas 24 amostras analisadas.

**Tabela 4. Determinação da presença ou ausência de crescimento microbiano a partir da inoculação direta do fragmento de MAh após os diferentes tempos do processo de desinfecção.**

Amostras (n=24 para cada grupo)	24 horas	48 horas	7 dias
Fragmentos de MAh contaminados experimentalmente	24*/24**	24*/24**	24*/24**
Fragmentos de MAh após 5 minutos de desinfecção	24*/24**	24*/24**	24*/24**
Fragmentos de MAh após 10 minutos de desinfecção	0*/24**	0*/24**	0*/24**
Fragmentos de MAh após 15 minutos de desinfecção	0*/24**	0*/24**	0*/24**

Fonte: Próprio Autor

\*representação do número de amostras com crescimento microbiano

\*\*representação total de 24 amostras.

#### 5.5 Análise Histológica

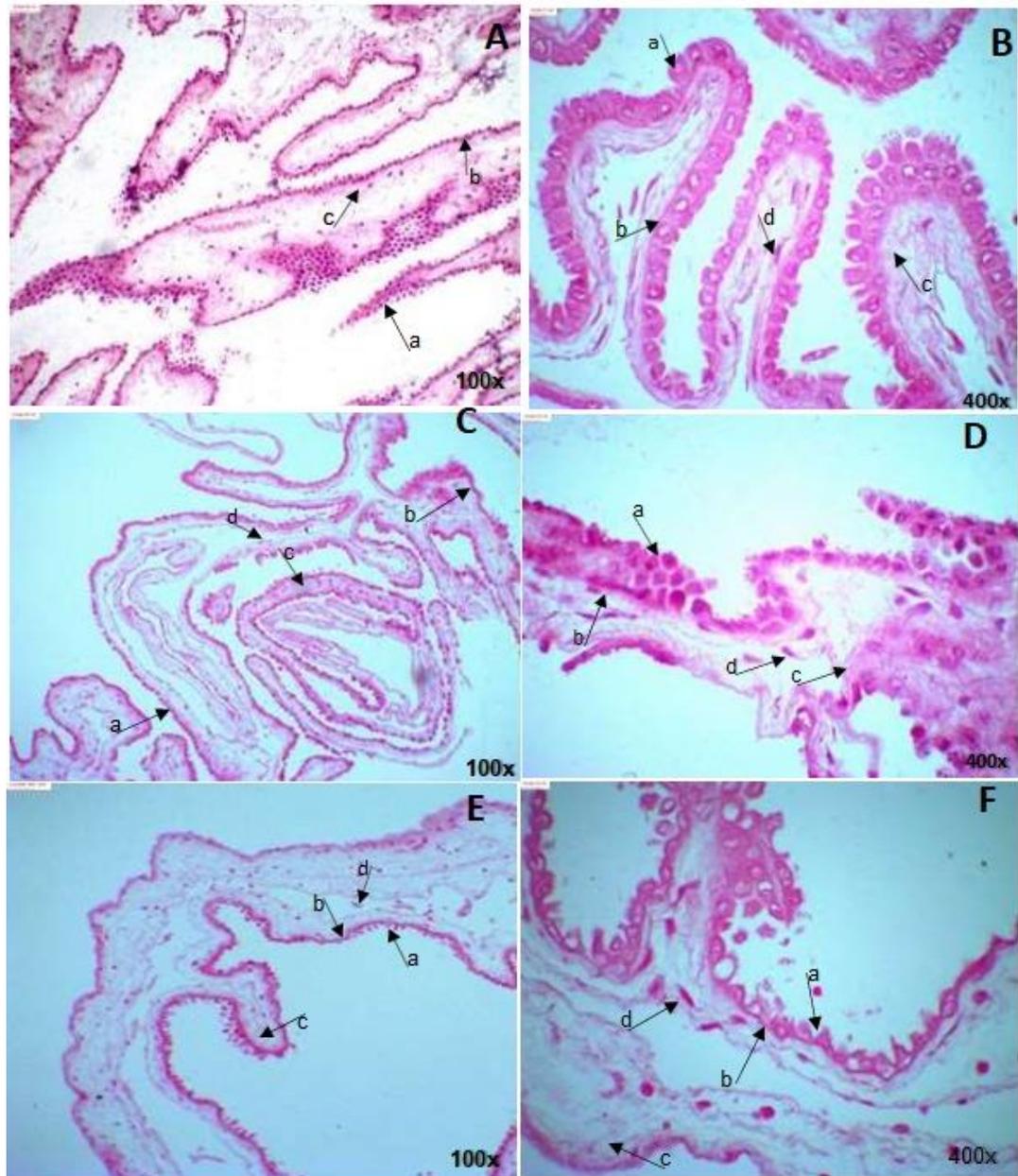
A figura 8 apresenta as imagens histológicas obtidas a partir de amostras *in natura* da MAh (A, B); amostras submetidas a 10 minutos (C, D) e 15 minutos (E, F) ao processo de desinfecção com água ozonizada.

Foram selecionados os tempos de 10 e 15 minutos para análise, porque o tempo de 5 minutos foi parcialmente efetivo para a desinfecção do biomaterial.

Os resultados demonstraram que as amostras (A, B) apresentaram células epiteliais cuboides (a); membrana basal (b) e estroma (c) preservados; além da presença de fibroblastos (d).

As amostras (C, D) apresentaram células epiteliais arredondadas (a); membrana basal (b) e estroma preservados (c), além da presença de fibroblastos (d).

As amostras (E, F), apresentam células epiteliais sem forma definida, com aspecto degenerado (a), membrana basal (b), estroma preservado (c) e a presença fibroblastos (d).



**Figura 8. Imagens histológicas das MAh, coradas com HE, sendo que (A, B) são amostras in natura; (C, D) amostras submetidas a 10 minutos de ozonização ( $3,9\text{mg}/\text{cm}^2$  ( $\text{O}_3$ )), (E, F) amostras submetidas a 15 minutos de ozonização ( $5,85\text{mg}/\text{cm}^2$  ( $\text{O}_3$ )). Seta a representa células epiteliais cuboides; Seta b membrana basal; Seta c estroma; Seta d fibroblasto.**

Fonte: Próprio Autor

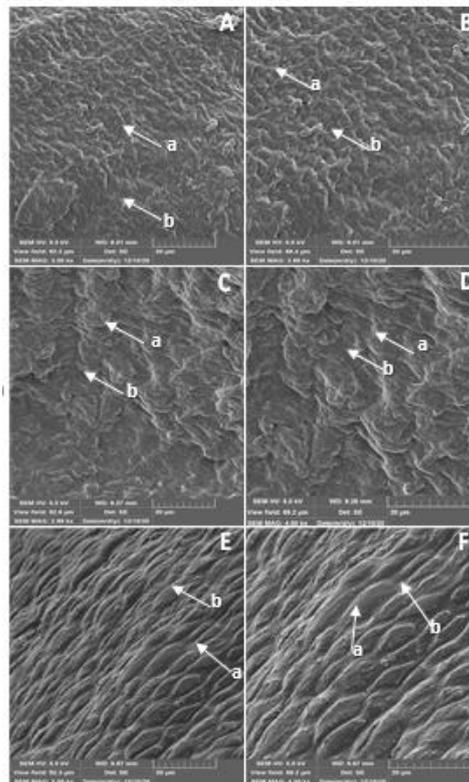
## 5.6 Análise da superfície da MAh através da MEV

A figura 9 representa as imagens obtidas a partir de MEV, sendo que (A, B) correspondem as amostras *in natura*. Nas imagens foi possível notar a sobreposição de células arredondadas e irregulares, demonstrando grande coesão entre os grupos celulares, que apresentaram um padrão de relevo irregular da superfície.

O epitélio apresenta-se preservado (Seta a) e espaços intercelulares pouco aparentes (Seta b). As amostras submetidas a 10 minutos de ozonização (C, D) apresentaram sobreposição de células irregulares na forma e tamanho.

As camadas de células se apresentaram em grupos de células maiores ou menores formando uma superfície irregular, presença e aumento dos espaços intercelulares (Seta b) e as células apresentam alterações morfológicas, de modo que não apresentam forma arredondada como nas amostras *in natura* (Seta a).

As amostras submetidas durante 15 minutos ao processo de desinfecção com água ozonizada (E, F) apresentaram uma camada de células poligonais alongadas (Seta a), tendendo a ficar em fila paralela, com limites definíveis, aumento dos espaços intercelulares, os quais se apresentam muito aparentes (Seta b).



**Figura 9.** Imagens de MAh obtidas a partir de MEV, sendo (A, B) amostras *in natura*; (C, D) amostras submetidas a 10 minutos de ozonização ( $3,9\text{mg}/\text{cm}^2$  ( $\text{O}_3$ )), (E, F) amostras submetidas a 15 minutos de ozonização ( $5,85\text{mg}/\text{cm}^2$  ( $\text{O}_3$ )). Seta a corresponde a células epiteliais cubóides; Seta b corresponde aos espaços intercelulares.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade do gás ozônio dissolvido na água realizar a desinfecção de MAh através da utilização de um sistema hidrodinâmico, além de verificar possíveis alterações morfológicas induzidas pelo processo no tecido biológico. Neste sentido, o ponto central do estudo foi promover um fluxo de água contínuo, com intuito de favorecer o arrasto e a remoção do material contaminante da superfície da MAh, simultaneamente empregar o ozônio como composto oxidante para eliminar as bactérias presentes na amostra biológica e na água.

De acordo com a determinação do número de Reynolds (Re) foi possível identificar que o regime de escoamento obtido no sistema hidrodinâmico apresentou um comportamento transitório (MARTINS, 2018), indicando que esse estágio de transição produziu o arrasto dos resíduos resultantes do processo de desinfecção da MAh, pois o valor de 2017 está mais próximo ao laminar, e se fosse ao contrário, com tendência ao turbulento, poderia romper ou danificar a estrutura da membrana ou até mesmo não ser efetivo na desinfecção da MAh.

Para garantir a atuação de um regime dinâmico laminar, pode-se reduzir o diâmetro do tubo pertencente ao cabeçote principal (Figura 4), ou como outra opção diminuir o fluxo da água através da bomba d'água, o que resultaria na diminuição da velocidade média de escoamento da água dentro do tubo de vidro. É importante também ressaltar que o design do dispositivo do porta-amostra em chapa de aço inoxidável, permitiu que o movimento da água, atuasse sobre as duas superfícies da amostra biológica. De fato, a pequena espessura desta peça (1 mm), garantiu a velocidade do fluido com o efeito de arraste para a remoção de material biológico pertinente a carga microbiana.

As amostras de MAh foram submetidas a contaminação experimental empregando-se suspensões microbianas de *S. aureus*, microrganismo selecionado pelos relatos encontrados, como no trabalho de Marsit et al. (2019) onde verificaram que esta bactéria está presente em amostras de MAh obtidas de parto cesariana. Estudos recentes *in vitro* tem demonstrado também que a água ozonizada foi eficiente na eliminação de *S. aureus in vitro* (AGOSTINI et al., 2020; MARTINELLI et al., 2017). Além disso, dados dos bancos de tecidos biológicos nacionais, relatam que um dos principais motivos do descarte desse material biológico está relacionado a

contaminação microbiana principalmente por bactérias (PAOLIN, 2017). Além disso, o *Guide to the Quality and Safety of Tissues and Cells for Human Application* (EDQM, 2017) descreve a presença de *S. aureus* como contaminante da MAh, e assim justifica o descarte do biomaterial em qualquer estágio do processamento.

Na análise microbiológica da água empregada no circuito hidrodinâmico para desinfecção não foi detectado crescimento microbiano em todas as amostras de água coletadas do sistema, indicando assim que, mesmo com o arraste das bactérias para o meio aquoso a concentração de ozônio dissolvido na água foi suficiente para eliminar as formas vegetativas. Para obter este resultado foi empregado como estratégia inserir as amostras de MAh contaminadas no sistema após 10 minutos de ozonização com o intuito de obter a saturação da concentração de ozônio dissolvido na água, que neste caso estava em torno de 2.7 mg/L (Figura 5). Os resultados obtidos demonstraram que esta estratégia foi eficiente para evitar a contaminação do sistema hidrodinâmico, sugerindo assim que o uso futuro deste sistema para a desinfecção de diversos materiais biológicos em banco de tecidos é potencialmente promissor.

A análise microbiológica da superfície das MAh com o auxílio de um *swab* demonstrou que após 5 minutos de desinfecção houve uma redução de 1 Log de crescimento microbiano, sendo que, após 10 e 15 minutos houve redução de 2 Log. Cabe destacar que após 10 e 15 minutos do processo de desinfecção não foram detectados crescimentos microbianos, indicando assim que o processo de desinfecção empregado foi eficiente.

Os dados obtidos na análise microbiológica direta do fragmento da MAh corroboram com os obtidos na análise da superfície com o *swab*, evidenciando que 10 minutos foram suficientes para não detectar crescimento microbiano nas amostras de MAh. Em contrapartida, no estudo de Velano et al. (2001) bactérias foram expostas durante 20 minutos a água ozonizada saturada (0,6 mg/L) para se obter o efeito desinfetante. Cabe destacar que a concentração média de ozônio dissolvida na água após 10 minutos em nosso sistema foi de 2,7 mg/L, sendo bem maior do que o empregado por Velano et al. (2001), além deste não ser um sistema hidrodinâmico como o empregado no presente estudo.

O sistema empregado no presente estudo para desinfecção de material biológico é inovador, porque combina dois efeitos: a atividade microbicida do ozônio dissolvido na água e o arraste dos microrganismos da superfície do material biológico pelo regime de escoamento hidrodinâmico. A escolha do uso da água ozonizada em

detrimento do gás ozônio apenas, se justifica pelo fato da MAh ser muito sensível ao processo de desidratação, sendo que o líquido amniótico é composto por 98-99 % de água (WHITTINGTON; MAGAN, 2021). Além disso, estudos têm demonstrado o efeito antimicrobiano da água ozonizada, sendo que estes destacam que o ozônio dissolvido na água é mais vantajoso do que o gás porque ele consegue manter por certos períodos seu poder oxidante no meio aquoso, sendo de fácil manuseio, mais seguro e com baixa toxicidade (NAGAYOSHI et al., 2004; AGOSTINI et al., 2020).

De acordo com o Guide to the Quality and Safety of Tissues and Cells for Human Application (EDQM, 2017) após a obtenção, a MAh deve ser colocada *overnight* em uma solução antimicrobiana composta de uma variedade de antibióticos de amplo espectro, além de um agente antifúngico, para então ser congelada a -80 °C. A MAh resultante é adequada para o tratamento de feridas infectadas, fornecendo uma concentração apropriada de antibióticos à superfície da ferida (EDQM, 2017). Com base nos resultados obtidos no presente estudo, a desinfecção da MAh empregando-se o sistema hidrodinâmico com água ozonizada é promissora para substituir as tradicionais soluções de antibióticos durante o processamento. Uma das principais vantagens desta substituição é que até o momento não foram descritos mecanismos de resistência microbiana com relação ao uso de água ozonizada. Neste sentido, novos estudos serão realizados para confirmar esta hipótese e incluir avaliação da suscetibilidade de diferentes microrganismos, como vírus, fungos e esporos.

As amostras foram submetidas a análise histológica e de MEV com o intuito de verificar possíveis alterações morfológicas e na superfície da MAh após os procedimentos de desinfecção. Foram selecionados os tempos de 10 e 15 minutos para análise, porque o tempo de 5 minutos foi parcialmente efetivo para a desinfecção do. Na análise histológica (Figura 5) das amostras de MAh *in natura* (A, B) foi possível verificar no biomaterial presenças de epitélio com células cuboides, é rara a presença de espaços intercelulares, presença de fibroblastos, membrana basal e estroma preservados, algumas células apresentaram vacúolo intracelular, essas características corroboram com as descrições de MAh *in natura* que foram relatadas por Fénelon et al. (2021). As amostras (C, D) submetidas ao processo de desinfecção com água ozonizada por 10 minutos, quando comparada ao grupo *in natura*, apresentaram alterações iniciais na forma das células epiteliais. Estas apresentaram forma mais arredondadas; houve um aumento dos espaços intercelulares e

afastamento das células. Enquanto, o estroma, a membrana basal e os fibroblastos se mantiveram preservados. Amostras da histologia (E, F) submetidas a 15 minutos em água ozonizada apresentaram redução na quantidade de células epiteliais com alterações morfológicas com formato alongado como visto na MEV (EF). Devido as alterações na irregularidade da forma das células epiteliais, a identificação dos espaços intercelulares ficou comprometida. As demais estruturas, membrana basal, fibroblastos e estroma se mantiveram preservados quando comparadas com as amostras *in natura*.

A análise comparativa entre as diferentes amostras, submetidas aos processos de desinfecção, demonstra que as alterações que ocorrem no epitélio se iniciam com 10 minutos e se intensificam com 15 minutos. No entanto, as estruturas mais internas, se mantém preservadas, fato esse de extrema relevância. Em estudos futuros, pretende-se avaliar se os fatores de crescimento e o potencial antimicrobiano da própria membrana são mantidos após o processo de desinfecção proposto. As análises das amostras *in natura* de MAh (A, B) obtidas a partir de MEV demonstraram a sobreposição de células arredondadas e irregulares, demonstrando grande coesão entre os grupos celulares, que apresentaram um padrão de relevo irregular da superfície. Esta descrição está de acordo com Pollard, Aye e Symonds (1976) que descreveram quatro padrões básicos morfológicos da superfície da MAh obtidos a partir de MEV. As amostras que foram submetidas durante 10 minutos ao processo de desinfecção com água ozonizada (C, D) apresentaram camadas de células irregulares na forma e tamanho. As camadas de células se apresentaram em grupos de células maiores ou menores formando uma superfície irregular.

A análise comparativa com as amostras *in natura* destacou que as células perderam sua forma arredondada, sendo que estas se mantiveram coesas, mas formando camadas com relevo muito mais irregular. É possível verificar um início de alterações no perfil morfológico das células, principalmente na sobreposição celular. Em contrapartida, as amostras que foram submetidas durante 15 minutos ao processo de desinfecção com água ozonizada (E, F) apresentaram-se como uma camada de células poligonais alongadas, tendendo a ficar em fila paralela, com limites definíveis, junções intercelulares muito aparentes. Esta descrição, se assemelha com o padrão 1 descrito por Pollard, Aye e Symonds (1976). A diferença está no fato de que as células poligonais não eram alongadas e apresentavam-se na forma de uma folha plana.

De acordo com as análises histológica e de MEV pode-se verificar que estas análises foram complementares, demonstrando que a partir de 10 minutos do processo de desinfecção iniciam-se as alterações morfológicas nas células da MAh, principalmente com relação a forma e sobreposição destas. Em contrapartida, após 15 minutos observou-se alterações significativas, demonstrando a presença de células cuboides alongados, no qual foi possível observar espaços intercelulares muito aparentes. Estas alterações eram esperadas uma vez que o dispositivo hidrodinâmico apresenta o tipo de escoamento transitório, o que significa que isso favorece significativamente o arrasto dos resíduos provenientes da oxidação do ozônio na amostra biológica.

A MAh possui algumas propriedades teciduais únicas, embora o mecanismo exato de muitas ações da MAh ainda não esteja claro. Vários efeitos benéficos da MAh foram sugeridos com base em sua composição biológica. Dados clínicos e experimentais mostraram que a MAh fornece um substrato compatível para o crescimento celular, facilitando a migração e diferenciação de células epiteliais, apoiando a manutenção do fenótipo epitelial original e tendo baixa ou nenhuma antigenicidade (EDQM, 2017; FÉNELON et al., 2021).

No presente estudo, na Figura 5 (E, F), as amostras submetidas a desinfecção durante 15 minutos com água ozonizada, fica evidente a irregularidade na forma das células epiteliais, a presença de vacúolos intracelulares indicando uma provável degeneração celular. Porém, há a preservação da membrana basal, estroma e fibroblastos, sugerindo assim, o uso promissor deste sistema na desepitelização de MAh.

Nos estudos de Covre et al. (2011), a membrana desepitelizada foi um *scaffold* eficiente para 83% dos explantes cultivados, enquanto no caso das amostras celularizadas a eficiência foi de 17%. Melo et al. (2007) concluíram que nos métodos de desepitelização tradicionais utilizando como tratamento a tripsina e a dispase, houve a completa retirada da membrana basal e do epitélio, e ainda o uso de EDTA eliminou boa parte da membrana basal.

Trosan et al. (2018) relataram em seus estudos sobre técnicas de desepitelização com o EDTA e a tripsina, que há a necessidade de realizar uma raspagem para remover os detritos celulares. Figueiredo et al. (2017) em estudos sobre desepitelização utilizando NaOH e antibióticos, relatam também a necessidade de raspagem para remoção de detritos celulares. Com base nestas informações, uma

outra possibilidade de uso do sistema hidrodinâmico seria empregá-lo futuramente para a desepitelização da MAh, prática comum quando se utiliza o biomaterial como *scaffold* em medicina regenerativa. Iranpour et al. (2018); Parveen et al. (2019); Moreira et al. (2021) e Awoyama et al. (2022) relataram em seus estudos utilizando peritônio bovino, que 10 minutos de aplicação de água ozonizada foram suficientes para preservação desse biomaterial, ao passo que com 15 minutos a viabilidade do material biológico ficou prejudicada. Nesse estudo como no de Moreira et al. (2021) ficou evidente que serão necessários novos estudos, ajustando o tempo ideal para que o processo de desepitelização ocorra.

## 7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a partir do sistema hidrodinâmico empregando água ozonizada para desinfecção de material biológico foi possível promover um fluxo de água contínuo, com regime de escoamento com comportamento transitório, o que favoreceu o arrasto e a remoção do material contaminante da superfície da MAh.

Além disso, o tempo de exposição e uma concentração mínima de 2,7 mg/L de ozônio dissolvido na água determinaram que a partir de 10 minutos (3,9 mg/cm<sup>2</sup> de O<sub>3</sub>) permitiu desinfetar as amostras de MAh de forma eficiente para *S. Aureus*.

A análise histológica comparativa entre as diferentes amostras, submetidas aos processos de desinfecção, demonstrou que as alterações ocorreram basicamente no epitélio, sendo que essas se iniciam com 10 minutos (3,9 mg/cm<sup>2</sup> de O<sub>3</sub>) e se intensificam com 15 minutos (5,85 mg/cm<sup>2</sup> de O<sub>3</sub>).

No entanto, as estruturas mais internas, se mantêm preservadas, fato esse de extrema relevância. Na análise das MAh por MEV pode-se verificar que essa foi complementar a análise histológica, demonstrando que a partir de 10 minutos do processo de desinfecção iniciam-se basicamente as alterações morfológicas no epitélio e que em 15 minutos temos alterações mais significativas nas células epiteliais.

Esses dados sugerem o uso promissor deste sistema na desepitelização de MAh pois, este biomaterial desepitelizado é muito empregado como *scaffold* em medicina regenerativa, no entanto, serão necessários novos estudos, para determinar o tempo necessário para que o processo efetuar o processo.

Cabe salientar que um dos usos clínicos da MAh está associado ao tratamento de feridas infectadas. Para tal a MAh deve ser processada empregando-se uma solução antimicrobiana composta de antibióticos de amplo espectro e um agente antifúngico.

Neste sentido, uma das possibilidades seria empregar o sistema hidrodinâmico de desinfecção com água ozonizada para substituir as soluções de antibióticos durante o processamento. Dentre as vantagens desta substituição é que até o momento não foram descritos mecanismos de resistência microbiana com relação ao uso de água ozonizada, além de não gerar resíduos químicos para serem descartados no meio ambiente.

O presente estudo mostra-se inovador e muito promissor, pois, traz diferentes usos e aplicações do sistema desenvolvido para a desinfecção e processamento de tecidos e materiais biológicos.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINI, Felipe et al. In Vitro Comparison of Antibacterial Effect of Ozonated Water and Ozonated Gas. **Ozone: Science & Engineering**, v. 43, n. 4, p. 394-400, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01919512.2020.1811636>> Acesso em: 28 mai.2018

ALDROVANI, Marcela; LAUS, José Luiz. Membranas amnióticas nas cirurgias reconstrutivas da superfície ocular. **INVESTIGAÇÃO**, v. 14, n. 2, p. 10-20, 2015. Disponível em: <<https://publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/article/view/867>> Acesso em: 28 mai. 2018.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 190, de 18 de julho de 2003**. Determina Normas Técnicas para o funcionamento dos bancos de sangue de cordão umbilical e placentário. Disponível em: <[http://www.ghente.org/doc\\_juridicos/resol190.htm](http://www.ghente.org/doc_juridicos/resol190.htm)> Acesso em: 01 fev. 2021.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC Nº 512, DE 27 de maio de 2021**. Dispõe sobre as Boas Práticas para Laboratórios de Controle de Qualidade. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-512-de-27-de-maio-de-2021-322975673>> Acesso em: 30 ago.2021.

AWOYAMA, Sílvia Móbille et al. Disinfection of Human Amniotic Membrane Using a Hydrodynamic System with Ozonated Water. **Ozone: Science & Engineering**, p. 1-13, 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01919512.2021.2022452>> Acesso em: 28 jan.2022.

BOCCI, Velio et al. Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. **Mediators of Inflammation**. Siena, v. 7, n. 1, 313–317, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1781866/pdf/9883965.pdf>> Acesso em: 28 mai. 2018.

BOCCI, Velio. **“Ozone” – A New medical drug**. Dordrecht: Springer Publishing, 2005. Disponível em: <[https://www.academia.edu/13091557/OZONE\\_A\\_New\\_Medical\\_Drug\\_OZONE\\_A\\_New\\_Medical\\_Drug](https://www.academia.edu/13091557/OZONE_A_New_Medical_Drug_OZONE_A_New_Medical_Drug)> Acesso em: 28 mai. 2018.

BORGES, Eline Lima; AMORIM, Itala Poliana Guimarães; CARVALHO, Daclé Vilma. Características dos pacientes com úlcera venosa atendidos nas unidades de Atenção Primária de Nova Lima, Minas Gerais. **Estima – Brazilian Journal of Enterostomal Therapy**, São Paulo, v. 12, n. 1, p.31-42, 2014. Disponível em: <<https://www.revistaestima.com.br/estima/issue/view/46/10>> Acesso em: 28 mai. 2018.

BOTELHO-ALMEIDA, Túlia de Souza et al. Evaluating the potential, applicability, and effectiveness of ozone sterilization process for medical devices. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 13, n. 2, p. 87-94, 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12247-017-9308-7>> Acesso em 13 jan.2020.

CORSETTI, Adriana. Repair of bone defects using adipose derived stem cells combined with alpha-tricalcium phosphate and gelatin sponge scaffolds in a rat model. **J Appl Oral Sci**, v.25, n.1, p.10-19, 2017. Disponível em:<<https://www.scielo.br/j/jaos/a/bpVLGxj6MVCFGqT4kqbthcd/?format=pdf&lang=en> > Acesso em: 26 jun.2020.

COVRE, Joyce Luciana. et al. Comparação entre membrana amniótica com e sem epitélio como substrato para cultura de células epiteliais do limbo ex vivo. **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**, v.74, n.2, p.114-117, 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abo/a/BPWGD5Th5MZrN75b4stgxwr/?lang=pt&format=pdf>> Acesso em: 28 mai. 2018.

DIAS, Derly Augusto. **Estudo in vitro dos efeitos da radiação ionizante em tecido ósseo por espectroscopia vibracional**. 2018. 73 f. [Mestrado em Ciências]. São Paulo: Ipen, 2018. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-27032019-120911/publico/2018DiasEstudo.pdf>> Acesso em:26 out. 2020.

DUARTE, Ian Goedert Leite. **Membrana amniótica como curativo biológico na cicatrização de feridas cutâneas com perdas de substância: estudo experimental em ratos**. 2014. 68 f. [Doutorado em m Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia]. Belo Horizonte: UFMG, 2014. Disponível em: <[https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-9Q3GR4/1/tese\\_ian\\_gl\\_duarte\\_2014.pdf](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-9Q3GR4/1/tese_ian_gl_duarte_2014.pdf)> Acesso em 20 mai. 2018.

ENCARNAÇÃO, Isis Carvalho. **Análise das propriedades físico-químicas e Mecânicas de arcabouço poroso composto de PLGA, cerâmica bifásica e sinvastatina de liberação lenta para engenharia de tecido ósseo**. 2016. 168 f. [Doutorado em Odontologia]. Florianópolis: UFSC, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/167741>> Acesso em: 20 mai. 2018.

EUROPEAN Directorate for The Quality of Medicines and Healthcare (EDQM). **Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application**. 3<sup>a</sup> ed. Strasbourg (France): EDQM/ Council of Europe, 2017. Disponível em: <[www.edqm.eu](http://www.edqm.eu)> Acesso em: 28 mai. 2018.

FÉNELON, Mathilde et al. Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. **Membranes**, v.11, n. 6, p.01-27, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2077-0375/11/6/387>> Acesso em 28 ago. 2021.

FERENCZY, Peter Alexander von Harbach; SOUZA, Luciene Barbosa de. . Comparação dos meios de preparação e preservação de membrana amniótica humana para uso no tratamento de doenças da superfície ocular. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 79, p. 71-80, 2020. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/rbof/a/ff73wgXw7f9MSNJyzf6g5Xg/?format=pdf&lang=pt>>  
Acesso em: 07 set. 2021.

FIGUEIREDO, G.S. et al. Gamma-irradiated human amniotic membrane decellularized with sodium dodecyl sulfate is a more efficient substrate for the ex vivo expansion of limbal stem cells. **Acta Biomaterialia**, v. 61, n. 1, p.124-133, 2017. Disponível em: <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1742706117304877?token=CB8C77AC7A3D30CF59798C8395E294DFF011AFB7A9D5D324C82D5474580E274632199CFBCF8D8588C1E52E7E6FF94092&originRegion=us-east-1&originCreation=20220202130001>> Acesso em 28 ago. 2021.

FISCHER, Michele Roberta et al. Biossíntese e caracterização de nanocelulose bacteriana para engenharia de tecidos. **Matéria**, v. 22, n.1, p. 1-17, 2017. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rmat/a/PCTW3X9zjG4HcYQtT4TYfCn/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em: 28 mai.2018.

FLÜGEL, Nayara Teixeira; GIRARDI, Bruna; WASILEWSKI, Daniel. Transplante de membrana amniótica em doenças da superfície ocular. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 79, n.6, p. 374-379, 2021. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbof/a/JsR9sHRcrXcRCZDxwTKdfjr/abstract/?format=html&lang=pt>> Acesso em 10 jan. 2022.

FONSECA, Pâmela Maria Moreira, et al. Preliminary Study: Comparative Analysis of the Effects of Ozone and Ultrasound on Streptococcus mutans. **Ozone: science & Engineering**, v. 43, n.3, p., 2021. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01919512.2020.1796581>> Acesso em 28 ago. 2021.

GAVIRIA-CASTELLANOS, Jorge L.; GÓMEZ-ORTEGA, Viviana; GUERRERO-SERRANO, Linda. Manejo de quemaduras faciales de segundo grado con membrana amniótica preservada en glicerol 85%. **Cirurgía Plástica Ibero-Latinoamericana**, v. 44, n. 4, p. 401-408, 2018. Disponível em: <[https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0376-78922018000400010](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0376-78922018000400010)> Acesso em: 28 nov. 2019.

GONÇALVES, José Carlos da Luz et al. Sistematização da assistência de enfermagem em uma gestante com Ruptura Prematura das Membranas Ovulares (RPMO): um relato de experiência. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 22, n.1, p. e282-e282, 2019. Disponível em: <<https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/282/398>> Acesso em 28 ago. 2021.

GONÇALVES, Nicolas Cardoso; SANT'ANNA, Luciana Barros. Potencial da membrana amniótica humana na medicina regenerativa. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 4, p. 99, 2021. Disponível em: <<https://editoraime.com.br/revistas/index.php/remsa/article/view/2856>> Acesso em 10 jan. 2022.

HAO, Yanxia et al. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. **Cornea**, v. 19, n. 3, p. 348-352, 2000. Disponível em: <[https://journals.lww.com/corneajrnl/fulltext/2000/05000/identification\\_of\\_antiangiogenic\\_and.18.aspx](https://journals.lww.com/corneajrnl/fulltext/2000/05000/identification_of_antiangiogenic_and.18.aspx)> Acesso em: 28 mai. 2018.

IRANPOUR, Sonia et al. Supportive properties of basement membrane layer of human amniotic membrane enable development of tissue engineering applications. **Cell and tissue banking**, v. 19, n. 3, p. 357-371, 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10561-017-9680-z>> Acesso em 28 ago. 2021.

ISAAC, César et al. Avaliação microscópica de técnicas de desepitelização de membranas amnióticas gliceroladas. **Revista Saúde – UNG-SER**. Guarulhos, v. 10, n. 3/4, p. 22-33, 2016. Disponível em: <<http://revistas.ung.br/index.php/saude/article/view/2489/1864>> Acesso em: 28 mai.2018

JACINTO, Roberta Bassi Soares et al. Utilização de ozônio para redução da carga microbiana em água de reuso. **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB 2014**. 2014. Disponível em: <[https://www.canal6.com.br/cbeb/2014/artigos/cbeb2014\\_submission\\_164.pdf](https://www.canal6.com.br/cbeb/2014/artigos/cbeb2014_submission_164.pdf)> Acesso em: 28 mai.2018

JIRSOVA, Katerina; JONES, Gary LA. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting—a review. **Cell and tissue banking**, v. 18, n. 2, p. 193-204, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10561-017-9618-5>> Acesso em: 28 mai. 2018.

KHOSRAVIMELAL, Sadjad et al. Protocols for decellularization of human amniotic membrane. **Methods in cell biology**, v. 157, n.1, p. 37-47, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0091679X19301347>> Acesso em: 28 mai. 2018.

KIM JC; TSENG SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. **Cornea**, v.14, n.5, p.473-484, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8536460/>> Acesso em: 28 mai. 2018.

KLUK, Edelaine et al. Uma abordagem sobre a clorexidina: ação antimicrobiana e modos de aplicação. **Revista Gestão & Saúde**, v. 14, n. 1, p.07-13, 2016. Disponível em: <<https://www.herrero.com.br/files/revista/filed7c1455420cd2e1375c5472da5538cad.pdf>> Acesso em: 28 mai. 2018.

KOLLER, J.; ORSAG, M. Skin grafting options at the Burn and Reconstructive Surgery Department of the Faculty Hospital in Bratislava. **Acta chirurgiae plasticae**, v. 48, n. 2, p. 65-71, 2006. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/16999270>>Acesso em: 28 mai. 2018.

LIMA, Manoel JA; FELIX, Erika P.; CARDOSO, Arnaldo A. Aplicações e implicações do ozônio na indústria, ambiente e saúde. **Química Nova**, v. 44, n. 09, p. 1151-1158, 2021. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/C8CDZCz4tnLqVr6Hr8LsYsd/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em 28 ago. 2021.

MAIDANA, W.; KREUTZ, C.; BERNARDI, R.; Análise de clarificação de efluentes industriais utilizando gerador eletrônico de ozônio, p. 6940-6947 . In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014. 19 a 22 de outubro de 2014.** Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0306-26090-150470.pdf>> Acesso em 28 ago. 2021.

MAMEDE, Ana C. et al. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 2, p. 447-458, 2012. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-012-1424-6>> Acesso em: 28 mai. 2018.

MARSIT, Nagi M. et al. Validation and assessment of an antibiotic-based, aseptic decontamination manufacturing protocol for therapeutic, vacuum-dried human amniotic membrane. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41598-019-49314-7>> Acesso em: 28 mai. 2018.

MARTINELLI, Mauro et al. Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology. **Journal of preventive medicine and hygiene**, v. 58, n. 1, p. 48-52, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5432778/>> Acesso em: 28 mai. 2018.

MARTÍNEZ PIZARRO, Sandra. Membrana placentária no tratamento de úlceras do pé diabético. **Enfermagem Investiga**, v. 5, n. 2, p. 04-06, 2020. Disponível em: < <https://revistas.uta.edu.ec/erevista/index.php/enfi/article/view/874> >. Acesso em: 15 out. 2020.

MARTINS, Luís Amaro Ribeiro. **Materiais Piezoelétricos Biodegradáveis para aplicações em Engenharia de Tecidos:** materiais piezoelétricos biodegradáveis para aplicações em engenharia de tecidos. 2018. 113 f. [Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas]. Braga: Universidade do Minho Escola de Ciências, 2018.

MAXIMIANO, Christian Viterbo. **Pré-condicionamento de sementes de milho em água com diferentes concentrações de ozônio no desenvolvimento inicial de plântulas e no controle de fusarium spp.** 2017. 67 f. [Mestrado em Agronomia]. Brasília: UnB, 2017. Disponível em: <[https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/23484/1/2017\\_ChristianViterboMaximiano.pdf](https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/23484/1/2017_ChristianViterboMaximiano.pdf)> Acesso em: 28 mai. 2018.

MELO, Gustavo Barreto de et al. Avaliação morfológica de diferentes técnicas de desepitelização da membrana amniótica humana. **Arq. Bras. Ophthalmol.** v.70, n.3, p.407-411, 2007. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abo/a/mCXg7GH99czf6LTjTWNcPwt/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em: 28 mai. 2018.

MERMET, Isabelle et al. Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. **Wound Repair and Regeneration**, v.15, n. 4, p.459-464. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17650088/>> Acesso em: 28 mai. 2018.

MOAT, John et al. Application of a novel decontamination process using gaseous ozone. **Canadian journal of microbiology**, v. 55, n. 8, p. 928-933, 2009. Disponível em: <<https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/w09-046/>> Acesso em: 28 mai. 2018.

MOREIRA, Hamilton; OLIVEIRA, Cinara S. de. Transplante de membrana amniótica. **Arq. Bras. Oftalmol.**, São Paulo , v. 63, n. 4, p. 303-305, 2000. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abo/a/XbydG5fhRkbLsqRXmdFkvfg/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em: : 28 mai. 2018.

MOREIRA, Livia Helena et al. Ozonation of Bovine Peritoneal Membrane for Preservation: Preliminary Investigation. **Ozone Science & Engineering**, 2021. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01919512.2021.1984205>> Acesso em : 20 nov.2021.

NAGAYOSHI, Masato et al. Antimicrobial Effect of Ozonated Water on Bacteria Invading Dentinal Tubules. **Journal of Endodontics**, v.30, n.11, p. 778–781, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0099239905600829>> Acesso em : 20 nov.2021.

NASCIMENTO, Mônica Helena Monteiro do; LOMBELLO, Christiane Bertachini. Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. **Polímeros**, v. 26, n. p. 360-370, 2016. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/po/a/BBk4WTRqzHwPzkJy5zVLmBk/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em : 20 nov.2021.

NOBRE, Rita Maria Lages. **Hidrogéis: Potencial de aplicação em Engenharia de Tecidos**. 2016. 67 f. [Mestrado em Ciências Farmacêuticas]. Algarve: Universidade Do Algarve, 2016. Disponível em: <[https://sapiencia.ualg.pt/bitstream/10400.1/9922/1/Monografia\\_RitaNobre\\_3\\_AG.pdf](https://sapiencia.ualg.pt/bitstream/10400.1/9922/1/Monografia_RitaNobre_3_AG.pdf)> Acesso em : 20 nov.2021.

OKUNO, Emico. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos avançados**, v. 27, n.1, p. 185-200, 2013. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/ea/a/xzD9Dgv8GPFtHkxkfbQsn4f/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em : 20 nov.2021.

OLIVEIRA, Fabianny Torres et al. Microrganismos e Resistência Antimicrobiana em feridas complexas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e10110212161, 2021. Disponível em: <

<https://www.rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12161/11024>> Acesso 10 jan 2022.

PAGGIARO, A. O. et al. Evaluation of Radiosterilized Glycerolated Amniotic Membranes as a Substrate for Cultured Human Epithelial Cells. **Organogenesis**, v.16, n.1, p. 27-41, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476278.2020.1723366?scroll=top&needAccess=true>> Acesso em : 20 nov.2021.

PAGGIARO, André Oliveira et al. Estabelecimento de protocolo de glicerolização de membranas amnióticas para uso como curativo biológico. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 1, p. 2-6, 2010. Disponível em: <<http://www.rbqueimaduras.com.br/details/25>> Acesso em 20 mai.2019

PAGGIARO, André Oliveira. **Efeitos da radiação ionizante em membranas amnióticas gliceroladas empregadas como substrato ao cultivo de epitélio humano**. 2011. 161 f. [Doutorado em Ciências]. São Paulo: USP, 2011. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5158/tde-24052011-143235/publico/AndreOliveiraPaggiaro.pdf>> Acesso em 02 jan.2022.

PAOLIN, Adolfo et al. Evaluation of allograft contamination and decontamination at the Treviso Tissue Bank Foundation: A retrospective study of 11,129 tissues. **PloS One**, v.12, n.3, p. e0173154, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5340366/>> Acesso em : 20 nov.2021.

PARVEEN, Shagufta et al. Amniotic membrane as novel scaffold for human iPSC-derived cardiomyogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 55, n. 4, p. 272-284, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11626-019-00321-y>> Acesso em : 20 nov.2021.

PEGORARO, Jéssica et al. Efeitos adversos do gluconato de clorexidina à 0, 12%. **Journal of Oral Investigations**, v. 3, n. 1, p. 33-37, 2015. Disponível em: <<http://seer.imed.edu.br/index.php/JOI/article/view/1036/670>> Acesso em 20 nov.2021.

PESSOA, João Luis Erbs; SCHIRMER, Janine; ROZA, Bartira de Aguiar. Avaliação das causas de recusa familiar a doação de órgãos e tecidos. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 26, n. 4, p. 323-330, 2013. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/ape/v26n4/v26n4a05.pdf>> Acesso em 20 nov.2021.

POLLARD, Stella M.; AYE, N. N.; SYMONDS, E. M. Scanning electron microscope appearances of normal human amnion and umbilical cord at term. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 83, n. 6, p. 470-477, 1976. Disponível em: <<https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-0528.1976.tb00868.x>> Acesso em: 28 mai. 2018.

RAMUTA, Taja Železnik; KREFT, Mateja Erdani. Human amniotic membrane and amniotic membrane-derived cells: how far are we from their use in regenerative and reconstructive urology?. **Cell transplantation**, v. 27, n. 1, p. 77-92, 2018. Disponível

em: < <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0963689717725528>> Acesso em 16 abr.2019.

REDIGUIERI, Carolina Fracalossi et al. Ozone Gas as a Benign Sterilization Treatment. **Tissue Engineering**, v. 22, n. 4, p. 338-347, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26757850/>> Acesso em 16 abr.2019.

REDIGUIERI, Carolina Fracalossi et al. The effect of ozone gas sterilization on the properties and cell compatibility of electrospun polycaprolactone scaffolds. **Journal of Biomaterials science, Polymer edition**, v. 28, n. 16, p. 1918-1934, 2017. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09205063.2017.1358549/>> Acesso em 16 abr.2019.

RICKLOFF, James R. An evaluation of the sporicidal activity of ozone. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 683-686, 1987. Disponível em: < <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/aem.53.4.683-686.1987>> Acesso em: 28 mai. 2018.

SCASSELLATI Catia et al. Ozone: a natural bioactive molecule with antioxidant property as potential new strategy in aging and in neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev.*, v. 63, n.1, p. 101-138, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163720302737>> Acesso em: 28 mai. 2018.

SEITZ, Berthold; HUCHZERMEYER, Cord. **Combined Ipsilateral Autologous Limbus and Homologous Amniotic Membrane Transplantation for Recurrent Symblepharopterygium.** 2018. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/327243788\\_Chapter-17\\_Combined\\_Ipsilateral\\_Autologous\\_Limbus\\_and\\_Homologous\\_Amniotic\\_Membrane\\_Transplantation\\_for\\_Recurrent\\_Symblepharopterygium](https://www.researchgate.net/publication/327243788_Chapter-17_Combined_Ipsilateral_Autologous_Limbus_and_Homologous_Amniotic_Membrane_Transplantation_for_Recurrent_Symblepharopterygium)> Acesso em: 28 mai. 2018.

SILVA, Jeferson Pereira et al. Eficácia dos curativos na cicatrização de úlceras do pé diabético. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 88, n. 26, p. 01-13, 2019. Disponível em: < <https://www.revistaenfermagematual.com/index.php/revista/article/view/56/448>> Acesso em: 16 maio 2020.

SILVA, Viviane Viana. Aplicação de biomateriais em ortopedia e engenharia de tecido ósseo. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 5, n. 2, p. 14-27, 2017. Disponível em: <<https://desafioonline.ufms.br/index.php/sameamb/article/view/4151>> Acesso em: 28 mai. 2018.

SILVA, Yngrid da Cruz et al. Ozônio como agente antimicrobiano na odontologia: revisão de literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia**, v. 51, n. 3, p. 97-107, 2021. Disponível em: <<https://periodicos.ufba.br/index.php/revfo/article/view/46784>> Acesso em: 28 mai. 2018.

SOARES, Fernando Augusto Neves. **Análise morfológica e biomecânica do âmnio conservado em glicerol esterilizado com diferentes doses de radiação ionizante.**

2013. 101 f. [Mestrado em Tecnologia Nuclear – Aplicações]. São Paulo: USP, 2013. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-08082013-125722/publico/2013SoaresAnalise.pdf>> Acesso em: 31 març. 2019.

SOUZA, Anailda Maria Pereira Lopes de. Avaliação do efeito da desinfecção por agentes químicos e da irradiação gama no poli(3-hidroxitirato): avaliação do efeito da desinfecção por agentes químicos e da irradiação gama no poli(3-hidroxitirato). 2016. 90 f. [Mestre em Engenharia Química]. Recife: UFPE, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/18633/1/disserta%c3%a7%c3%a3o%20CENTRAL%20FINAL.pdf>> Acesso em: 31 març. 2019.

SOUZA, Carlos Eduardo Borges et al. **Avaliação da contaminação microbiana da membrana amniótica e líquido amniótico**. Arq. Bras. Oftalmol. v.67, n.5, p. 709-712, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abo/a/vHPKsgfLDYXk46sXzmd43YG/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em: 28 mai. 2018.

STEFFEN, Niveo. Manual Para Implantação De Banco De Pele Humana No Brasil. 2018. 92 f. [Mestrado em Ciências]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina/CAPES, 2018. Disponível em: [https://repositorio.unifesp.br/bitstream/handle/11600/52623/Disserta%c3%a7%c3%a3o\\_NIVEO-STEFFEN.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unifesp.br/bitstream/handle/11600/52623/Disserta%c3%a7%c3%a3o_NIVEO-STEFFEN.pdf?sequence=1&isAllowed=y)> Acesso em: 31 març. 2019.

SUN, Yikan et al. Effects of SCCO<sub>2</sub>, gamma irradiation, and sodium dodecyl sulfate treatments on the initial properties of tendon allografts. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 5, p. 1565, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/5/1565>> Acesso em 15 fev.2021.

TEHRANI Fatemeh DadKhah, et al. A Review on Modifications of Amniotic Membrane for Biomedical Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n.1, p. 01-25, 2021. Disponível em: [https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.606982/full?utm\\_source=researcher\\_app&utm\\_medium=referral&utm\\_campaign=RESR\\_MRKT\\_Researcher\\_inbound](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.606982/full?utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=RESR_MRKT_Researcher_inbound)> Acesso em 20 mai. 2021.

TROSAN, Peter et al. The enzymatic de-epithelialization technique determines denuded amniotic membrane integrity and viability of harvested epithelial cells. **Plos one**, v. 13, n. 3, p. e0194820, 2018. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0194820>> Acesso 26 nov.2019.

TZAPHLIDOU, M. Collagen as a model for the study of radiation induced side effects: use of image processing. **Micron**, v. 33, n. 2, p. 117-120, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0968432801000099>> Acesso 26 nov.2019.

VAN HERENDAEL, BJv; OBERTI, C.; BROSENS, Ivo. Microanatomy of the human amniotic membranes: a light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 131, n. 8, p.

872-880, 1978. Disponível em: <  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002937816331350>> Acesso em:  
28 mai. 2018.

VASQUES, Edson José; MENEGASSO, Paulo; SOUZA, Mariano de. Explorando a conexão entre a mecânica dos fluidos e a teoria cinética. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 38, n.1, p. 01-09, 2016. Disponível em: <  
<https://www.scielo.br/j/rbef/a/ypNWX4Zngx3C498yxqmbkdF/?format=pdf&lang=pt>>  
Acesso 26 nov.2019.

VELANO, Helena Engel et al. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15,n. 1, p. 18-22, 2001. Disponível em: <  
<https://www.scielo.br/j/pob/a/CHH79hwyPZdQXmKdn4SVhkn/?format=pdf&lang=pt>>  
Acesso 26 nov.2019.

WHITTINGTON Julie.R., MAGAN Pet EF. 2021. **Amniotic Fluid: Physiology and Assessment**. Disponível em: < <https://www.glowm.com/article/heading/vol-4--fetal-development-and-maternal-adaptation--amniotic-fluid-physiology-and-assessment/id/410553>> Acesso em 10 jan 2022.

WOLLMANN, Luciana et al. Caracterização do Pericárdio Humano Descelularizado para Engenharia de Tecidos e Aplicações de Medicina Regenerativa. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. p. 11-17, 2019. Disponível em: <  
<https://www.scielo.br/j/abc/a/tBCc3kMwQdLhptvTn5bsCFJ/?lang=pt&format=pdf>>  
Acesso em: 26 jun.2020.

## ANEXOS

### UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

Doutorado em Engenharia Biomédica

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa intitulado: **Utilização do Ozônio na desinfecção de Membrana Placentária**. O objetivo do presente trabalho é utilizar o Ozônio na desinfecção de membrana placentária humana.

Ressaltamos que sua participação é voluntária, portanto, você não receberá pagamento e nem terá despesas com essa pesquisa. Os resultados obtidos poderão contribuir para comprovar se o Ozônio seria capaz de realizar a desinfecção de membranas amnióticas contaminadas experimentalmente.

As informações obtidas serão utilizadas somente para a presente pesquisa. Em nenhum momento sua identidade será revelada inclusive quando forem publicados os resultados desta pesquisa, conforme disposto na Resolução 466/2012 - CNS, assegurando dessa forma a confidencialidade, sigilo e o anonimato das participantes do estudo. As informações fornecidas pelo senhor (a) permanecerão arquivadas por um período de 10 anos, e após esse tempo serão destruídas.

O motivo dessa pesquisa é por que a membrana amniótica vem sendo cada vez mais utilizada na regeneração e reparação de tecido humano em quase todas as áreas da medicina regenerativa, para tantas técnicas de desinfecção e esterilização e armazenamento devem ser protocolados com a segurança.

O material biológico (membrana placentária) será coletado conforme determina as Normas Técnicas para o funcionamento dos bancos de sangue de cordão umbilical e placentário segundo a Resolução - RDC nº 190, de 18 de julho de 2003.

O material será fracionado em partes medindo 5 cm<sup>2</sup>, estas serão contaminados experimentalmente com *S. aureus* (10<sup>3</sup> UFC/mL) e submetidos a análise microbiológica quantitativa antes e após a aplicação do Ozônio. Além disso, será realizada análise histológica e por Espectroscopia Raman para verificar se houve preservação das características morfológicas após aplicação da água ozonizada.

A Senhora (o), poderá retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu atendimento na Instituição. Informamos que você tem direito a uma indenização segundo as leis vigentes caso você se sinta prejudicada pelo estudo. Em caso de dúvida deve-se entrar em contato com os pesquisadores: nos telefones: ou através do E-mail: ou com o orientador da pesquisa: Adriana Barrinha Fernandes Moretti, no telefone: (11) 97699-6918, ou através do E-mail: fernandesabm@gmail.com / pesquisador: Sílvia Móbbille Awoyama , no telefone (12) 981838299 ou através do e-mail: [awoyama@terra.com.br](mailto:awoyama@terra.com.br).

. Em caso de dúvida sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi, endereço: E-mail: [cep@anhmebi.br](mailto:cep@anhmebi.br)

Após receber os esclarecimentos se você aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias e se conter mais de uma página todas as páginas deverão ser rubricadas por todos os participantes do estudo, sendo que a primeira via ficará com o Pesquisador responsável e a segunda via ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins.

. Em caso de dúvida sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi, endereço: E-mail: [cep@anhmebi.br](mailto:cep@anhmebi.br)

Após receber os esclarecimentos se você aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias e se conter mais de uma página todas as páginas deverão ser rubricadas por todos os participantes do estudo, sendo que a primeira via ficará com o Pesquisador responsável e a segunda via ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins.

. Em caso de dúvida sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi, endereço: E-mail: [cep@anhmebi.br](mailto:cep@anhmebi.br)

Após receber os esclarecimentos se você aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias e se conter mais de uma página todas as páginas deverão ser rubricadas por todos os participantes do estudo, sendo que a primeira via ficará com o Pesquisador responsável e a segunda via ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins.

DECLARAÇÃO do participante: Eu \_\_\_\_\_, declaro que compreendi as informações do que li ou que me foram explicadas sobre o trabalho em questão. Discuti com a pesquisadora Sílvia Móbbille Awoyama, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de assistência integral e gratuita por danos diretos e indiretos, imediatos ou tardios quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento,

sem a necessidade de justificar os motivos de minha desistência antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

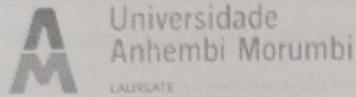
PINDAMONHANGABA, \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do Participante

---

Assinatura do Responsável pelo Estudo



**Ao Sr. Luciano Rodrigues Nascimento**

*Diretor Administrativo da Santa Casa de Misericórdia de Pindamonhangaba*

#### CARTA DE AUTORIZAÇÃO

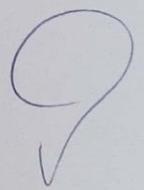
Eu, Sílvia Móbille Awoyama, acadêmica do programa de Doutorado de Engenharia Biomédica da Universidade Anhembi Morumbi, realizado no CITÊ – Centro de Inovação Tecnológica em Saúde, situado no Parque Tecnológico de São José dos Campos. Estrada Dr. Altino, 500 Distrito de Eugênio de Melo, São José dos Campos, estou desenvolvendo pesquisa sob a orientação da Profª Drª Adriana Barrinha Fernandes Moretti, cujo título é: **Utilização do Gás Ozônio na desinfecção de Membrana placentária**. O objetivo geral desta pesquisa é analisar a eficácia do Gás Ozônio na desinfecção de membrana placentária.

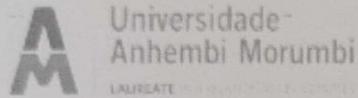
Solicito a sua autorização para ter acesso ao centro cirúrgico desta instituição juntamente com o serviço de enfermagem com dia e hora agendados junto a Diretora de enfermagem Vanessa E. Gomes Bueno, para coletar 02 (duas) placentas via parto cesárea. Após a coleta, imediatamente serão removidas suas membranas ovulares. Desta forma, será necessário que eu permaneça em sala operatória durante o procedimento cirúrgico a fim de manipular a placenta dentro das condições exigidas pelo protocolo de desinfecção das membranas, mas sem atrapalhar o atendimento da equipe médica obstétrica. Também será realizada a captura de imagens somente do procedimento em questão.

Saliento que esta pesquisa seguirá todos os preceitos éticos estabelecidos, diretrizes e normas por envolver seres humanos em pesquisa, de acordo com a Resolução 466/12 de 12/12/2012 do Conselho Nacional da Saúde.

Esta pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com o número do parecer: 2829910.

As duas parturientes que contemplarem os critérios de inclusão serão abordadas e será lhes apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com todos os detalhes quanto a anonimato, risco mínimo e sigilo, bem como não remuneração e ônus durante seu atendimento na Instituição e também o termo de autorização de registro de imagem do procedimento em sala operatória.





Conto com a sua colaboração estou a disposição para possíveis esclarecimentos e desde já agradeço.

Silvia Móbille Awoyama Pindamonhangaba – SP 09/09/2019

Sílvia Móbille Awoyama – RG: 11.555.640-0

Contato: (12) 981838299

Adriana Barrinha F. Moretti São José dos Campos – SP 09/09/2019

Adriana Barrinha Fernandes Moretti – RG: 26.849.939-1

Contato: (11) 97699.6918 e (12) 3945.1359

De acordo: Luciano Rodrigues Nascimento Diretor Administrativo

Luciano Rodrigues Nascimento – RG: 23240883-X

Pindamonhangaba – SP, 09/09/2019

Dr. Francisco Paulo Martins Freire  
CRM 103472 - Nefrologista  
CNS: 2015513948100004

Vanessa Gomes Bueno  
Diretora de Enfermagem  
CREM 0128674



UNIVERSIDADE ANHEMBI  
MORUMBI/ INSTITUTO  
SUPERIOR DE COMUNICAÇÃO



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** UTILIZAÇÃO OZÔNIO NA DESINFECÇÃO DE MEMBRANA PLACENTÁRIA

**Pesquisador:** Adriana Barrinha Fernandes Moretti

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 95144818.8.0000.5492

**Instituição Proponente:** Universidade Anhembi Morumbi/ Instituto Superior de Comunicação

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.829.910

#### Apresentação do Projeto:

A membrana amniótica vem sendo cada vez mais utilizada na regeneração e reparação de tecido humano em quase todas as áreas da medicina regenerativa, para tanto técnicas de desinfecção e esterilização e armazenamento devem ser protocolados com a segurança. O objetivo do presente trabalho é utilizar o Ozônio na desinfecção de membrana placentária humana. O material biológico (membrana placentária) será coletado conforme determina as Normas Técnicas para o funcionamento dos bancos de sangue de cordão umbilical e placentário segundo a Resolução - RDC nº 190, de 18 de julho de 2003. O material será fracionado em partes medindo 5 cm<sup>2</sup>, estas serão contaminados experimentalmente com *S. aureus* (10<sup>3</sup> UFC/mL) e submetidos a análise microbiológica quantitativa antes e após a aplicação do Ozônio. Além disso, será realizada análise histológica e por Espectroscopia Raman para verificar se houve preservação das características morfológicas após aplicação da água ozonizada. Espera-se que nas análises histológicas o Ozônio conserve as características morfológicas da membrana e nas análises microbiológicas espera-se que o Ozônio promova a desinfecção da mesma.

**Endereço:** Rua Casa do Ator, 294 - 7º andar - Unidade 5

**Bairro:** Vila Olímpia

**CEP:** 04.546-000

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3847-3033

**Fax:** (11)3847-3232

**E-mail:** ctorres@anhemi.br



UNIVERSIDADE ANHEMBI  
MORUMBI/ INSTITUTO  
SUPERIOR DE COMUNICAÇÃO



Continuação do Parecer: 2.829.910

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

O objetivo primário do presente trabalho é utilizar o Ozônio na desinfecção de membrana placentária humana.

**Objetivo Secundário:**

- Determinar a dosagem de ozônio mais eficiente na desinfecção de membranas amnióticas através da análise microbiológica;- Verificar se o ozônio induz alterações morfológicas nas membranas amnióticas através da análise histológica;- Avaliação das membranas amnióticas através de Espectroscopia Raman com o intuito de comparar com os dados obtidos com a análise histológica.- Analisar se a água ozonizada pode substituir os antibióticos no acondicionamento nas membranas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Os riscos são mínimos, uma vez que a placenta é retirada da paciente e normalmente é descartada.

**Benefícios:**

Oferecer informação segura baseada em pesquisa científica para a comunidade sobre novas técnicas de desinfecção.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

É um projeto com condições de realização, claramente definido em termos metodológicos e logísticos, caracterizando exequibilidade na proposta.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Estão adequados e contemplam as exigências da resolução 466/12.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

1. Apresentar relatório parcial da pesquisa, semestralmente, a contar do início da mesma.
2. Apresentar relatório final da pesquisa até 30 dias após o término da mesma.
3. O CEP UAM deverá ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o

**Endereço:** Rua Casa do Ator, 294 - 7º andar - Unidade 5

**Bairro:** Vila Olímpia

**CEP:** 04.546-000

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3847-3033

**Fax:** (11)3847-3232

**E-mail:** ctorres@anhembi.br