

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

FRANCISCO DIMITRE RODRIGO PEREIRA SANTOS

**TÉCNICA DE DESEPITELIZAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA
UTILIZANDO ULTRASSOM E ÁGUA OZONIZADA EM FLUIDO DINÂMICO**

TESE DE DOUTORADO

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

São José dos Campos, outubro/2024

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI
FRANCISCO DIMITRE RODRIGO PEREIRA SANTOS**

**TÉCNICA DE DESEPITELIZAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA
UTILIZANDO ULTRASSOM E ÁGUA OZONIZADA EM FLUIDO DINÂMICO**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Barrinha Fernandes Moretti
Coorientador: Prof. Dr. Carlos José de Lima

São José dos Campos, outubro/2024

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI
FRANCISCO DIMITRE RODRIGO PEREIRA SANTOS

**TÉCNICA DE DESEPITELIZAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA
UTILIZANDO ULTRASSOM E ÁGUA OZONIZADA EM FLUIDO DINÂMICO**

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

Prof^a. Dr^a. Adriana Barrinha Fernandes Moretti (Orientadora)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. João Gomes de Oliveira Neto (Externo)

Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Túlia de Souza Botelho (Externo)

Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Carlos José de Lima (Interno)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Leandro Procópio Alves (Interno)

Universidade Anhembi Morumbi

São José dos Campos, outubro/2024

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

FRANCISCO DIMITRE RODRIGO PEREIRA SANTOS

Graduado em Fisioterapia, pela Faculdade Montes Belos.
Mestre em Ciências da Saúde, pela Universidade Federal do Tocantins.

Ficha Bibliográfica elaborada pela Biblioteca UAM
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S235f Santos, Francisco Dimitre Rodrigo Pereira
Técnica de desepitelização da membrana amniótica humana utilizando ultrassom e água ozonizada em fluido dinâmico / Francisco Dimitre Rodrigo Pereira Santos – 2024.
53f.: 30 cm.

Orientadora: Profa. Adriana Barrinha Fernandes Moretti.
Tese (Doutorado) Curso de Engenharia Biomédica – Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2024.
Bibliografia: f. 44 - 52.

1. Âmnio 2. Membrana Amniótica Humana 3. Desepitelização
4. Ozônio 5. Ultrassom 6. Biomateriais 7. Engenharia de tecidos
I. Título.

CDD 616

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao professor Antonio Guillermo Jose Balbin Villaverde (*in memoriam*), que foi o meu primeiro orientador neste Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica.

Dedico ainda a todos os meus familiares, em nome da minha irmã Vitória Gabriela Santos Lopes.

AGRADECIMENTOS

Chegar para agradecer e louvar.
Louvar o ventre que me gerou
O orixá que me tomou,
E a mão da doçura de Oxum que consagrou.
Louvar a água de minha terra
O chão que me sustenta, o palco, o massapê,
A beira do abismo,
O punhal do susto de cada dia.
Agradecer as nuvens que logo são chuva,
Sereniza os sentidos
E ensina a vida a reviver.
Agradecer os amigos que fiz
E que mantém a coragem de gostar de mim, apesar de mim...
Agradecer a alegria das crianças,
As borboletas que brincam em meus quintais, reais ou não.
Agradecer a cada folha, a toda raiz, as pedras majestosas
E as pequeninas como eu, em Aruanda.
Agradecer o sol que raia o dia,
A lua que como o menino Deus espraia luz
E vira os meus sonhos de pernas pro ar.
Agradecer as marés altas
E também aquelas que levam para outros costados todos os males.
Agradecer a tudo que canta no ar,
Dentro do mato sobre o mar,
As vozes que soam de cordas tênues e partem cristais.
Agradecer os senhores que acolhem e aplaudem esse milagre.
Agradecer,
Ter o que agradecer.
Louvar e abraçar!

(Maria Bethânia)

Agradeço a Deus, por sempre me conceder a força necessária para perseverar ao longo desta caminhada. Expresso meu profundo e incondicional agradecimento à minha mãe, Maria Katia Cilene Pereira Santos, que sempre acreditou no poder transformador da educação em minha vida, o que, de fato, se concretizou. Se hoje receberei este título de Doutor, é graças à sua crença inabalável e apoio constante. À minha avó, Maria Mirtes Pereira Santos, sou eternamente grato pelos ensinamentos preciosos que levarei comigo por toda a vida: humildade, generosidade e sinceridade.

Agradeço a todos os meus professores do ensino fundamental em nome da minha professora Ana Lize de Araújo Pereira e aos do ensino médio em nome do meu professor Cleber Borges Moraes. Lembro-me como se fosse hoje de quando entrava na sala de aula cheio de sonhos e vocês acreditavam em mim e seguravam minha mão, me guiando para o caminho certo até o ingresso no ensino superior. Nunca esquecerei de vocês, vocês foram e são a minha base. Muito obrigado por tanto.

Às professoras Aline Cristina Resende e Alana Pereira, que tiveram um papel fundamental na minha formação durante a graduação, expresso minha mais profunda

gratidão. Suas aulas inspiradoras e dedicação ao ensino despertaram em mim o interesse e a paixão pelo conhecimento, que continuam a me guiar até hoje. Suas contribuições foram cruciais para a construção da minha trajetória acadêmica, e levo comigo os ensinamentos que transmitiram com tanto empenho e cuidado.

Agradeço a todos os meus amigos em nome do José Fernando Bezerra Miranda e Júlio Cesar Araújo de Sousa, que sempre estiveram ao meu lado durante este processo. Agradeço ao meu companheiro, Arthur Barros Fernandes, por diversas vezes me ouvir e me apoiar a continuar mediante a todas as tribulações.

Gostaria de expressar minha mais sincera gratidão à minha orientadora, Prof. Adriana Barrinha Fernandes Moretti e ao Prof. Carlos José de Lima, por todo apoio inestimável, orientação e paciência ao longo deste percurso. A dedicação, expertise e encorajamento de vocês foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese. Agradeço imensamente pelos conselhos, pelas valiosas contribuições e por sempre me motivar a buscar o melhor. Sem a orientação de vocês, este trabalho não seria possível.

Agradeço a Bianca Akemi Kawata, que com toda sua paciência me orientou cautelosamente na análise dos dados deste trabalho. Tenho maior orgulho em falar que aprendi com você. Você é um presente na minha vida.

Agradeço a todos os alunos do Laboratório de Desinfecção e Esterilização do Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITÉ) em nome do Pedro Augusto Laurindo Igreja Marrafa, um amigo especial que a pós-graduação me deu. À Nídia Lucia Domingues Macedo e todos os professores do Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida para realizados dos meus estudos e a Universidade Anhembi Morumbi por me oportunizar o título de doutor.

Por fim, mas não menos importante, agradeço as pacientes que voluntariamente doaram os materiais para a realização deste estudo e agradeço ainda às instituições que foram parceiras neste processo. A Santa Casa de Misericórdia de Pindamonhangaba, o Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMar) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), o Departamento de Engenharia Mecânica do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA) e a Coordenação de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (COPDT/INPE).

RESUMO

A Membrana Amniótica Humana (MAH) é uma película fina, sendo a mais interna das membranas fetais e geralmente é descartada após o parto. Para uso clínico, a MAH precisa ser devidamente processada com técnicas adequadas de desinfecção/esterilização e em alguns casos deve ser submetido ao processo de desepitelização. O objetivo deste estudo preliminar foi avaliar se o sistema com água ozonizada e ultrassom causa desepitelização da MAH. O protocolo do experimento foi realizado em quatro etapas. A primeira etapa foi realizada para determinar o tempo do experimento. Na segunda etapa, uma MAH foi incluída e dividida em quatro grupos de amostras em triplicata, sendo controle/*in natura* (IN), processada com ultrassom em meio líquido (US), processada com água ozonizada (O₃) e processada com água ozonizada combinada com ultrassom (US_O₃). Para confirmar os resultados, a terceira etapa foi realizada com uma MAH, seguindo os mesmos passos da segunda etapa. A quarta e última etapa foi realizada após análise dos resultados da terceira etapa, análise histológica foi realizada para verificar se os efeitos do gás O₂ eram semelhantes aos do gás O₃. O sistema foi ativado, e foi realizada ozonização prévia de 10 min, que atingiu um nível de concentração de ozônio de 3,0 mg/L. As amostras foram submersas e posicionadas no reservatório e processadas separadamente por 55 min. As propriedades físico-químicas foram analisadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e morfologia com histologia e microscopia eletrônica de varredura. Os espectros das amostras exibiram similaridade, no entanto, mudanças sutis podem ser destacadas, como mudanças suaves de banda e mudanças de intensidade. A morfologia indicou que o ultrassom atingiu uma desepitelização mais eficiente da MAH em comparação ao ultrassom combinado com água ozonizada e água ozonizada sozinha. Uma hipótese plausível para esta observação é que a cavitação representa o mecanismo primário responsável pela desepitelização. Quando o ultrassom é combinado com ozônio, as bolhas geradas pelo gás ozônio reduzem o efeito da cavitação. O presente estudo é pioneiro, pois demonstra que o sistema com ultrassom é capaz de desepitelizar eficientemente o MAH.

Palavras-chave: Âmnio; Membrana Amniótica Humana; Desepitelização; Ozônio; Ultrassom; Biomateriais; Engenharia de Tecidos.

TECHNIQUE FOR DE-EPITHELIZING THE HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE USING ULTRASOUND AND OZONIZED WATER IN DYNAMIC FLUID

ABSTRACT

The Human Amniotic Membrane (HAM) is a thin film, which is the innermost of the fetal membranes and is usually discarded after delivery. For clinical use, HAM needs to be properly processed with appropriate disinfection/sterilization techniques and in some cases must be subjected to the de-epithelialization process. This study aimed to evaluate if a system involving ozonated water and ultrasound causes de-epithelialization of the Human Amniotic Membrane (HAM). The experiment protocol was carried out in four stages. Stage I was carried out to determine the time of the experiment. Stage II comprised the first experiment, involving four groups of samples studied in triplicate: control/natural (IN), processed with ultrasound in a liquid medium (US), processed with ozonated water (O₃), and processed with ozonated water combined with ultrasound (US_O₃). Stage III stage was performed to confirm the results, following the same steps present in stage II. Stage IV involved the use of oxygen to confirm the hypothesis. Histological analysis was carried out to verify whether the effects of O₂ were similar to those of O₃. The system was activated, and ozonation was carried out for 10 min, as used in the previous experiment, which reached an ozone concentration level of 3.0 mg/L. The samples were submerged and positioned in the reservoir and processed separately for 55 min. The physical-chemical properties were assessed using Fourier transform infrared spectroscopy, and the morphology was examined using histology and scanning electron microscopy. The spectra of the samples exhibited similarities; however, subtle changes were highlighted, such as smooth band shifts and intensity changes. The morphology indicated that ultrasound achieved more efficient HAM de-epithelialization compared to ultrasound combined with ozonated water and ozonated water alone. One plausible hypothesis for this observation is that cavitation represents the primary mechanism responsible for de-epithelialization. When ultrasound is combined with ozone, the bubbles generated by ozone gas reduce the cavitation effect. This study is pioneering as it demonstrates an ultrasound system capable of the efficient de-epithelialization of the HAM.

Keywords: Amnion; Human Amniotic Membrane; De-epithelialization; Ozone; Ultrasound; Biomaterials; Tissue Engineering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das camadas da Membrana Amniótica Humana	18
Figura 2. Etapas do protocolo do experimento	25
Figura 3. Suporte da Membrana Amniótica Humana	26
Figura 4. Vista superior do reservatório principal, com o posicionamento da amostra	27
Figura 5. Representação esquemática do sistema hidrodinâmico com ozônio e ultrassom	28
Figura 6. Imagens histológicas do estudo piloto em seis tempos distintos	31
Figura 7. Curva de concentração de ozônio (O ₃) dissolvido em água	33
Figura 8. Espectros obtidos por FT-IR das amostras	34
Figura 9. Imagens histológicas das amostras do experimento	38
Figura 10. Imagens obtidas por MEV-FEG das amostras do experimento	39
Figura 11. Imagens histológicas das amostras processadas no sistema para confirmação de hipótese	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição da divisão das amostras nos grupos experimentais	30
Tabela 2. Atribuição dos grupos funcionais e principais bandas do espectro da MAH	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MAH - Membrana Amniótica Humana

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FT-IR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

FEG - *Field Emission Gun*

EDTA - *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)

O₃ - Gás ozônio

O₂ - Oxigênio

H₂O – Água

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

OH⁻ - Ânion Hidroxila

CAAE - Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CITÉ - Centro de Inovação, Tecnologia e Educação

IN - *In natura*.

PVC - Policloreto de Vinila

TO₃ - Taxa de produção de ozônio

m - Quantidade de massa de O₃ entregue (mg)

D - Dosagem de O₃ aplicada por cm² [mg/cm²]

IEAMar - Instituto de Estudos Avançados do Mar

Unesp - Universidade Estadual Paulista

UATR - *Universal Attenuated Total Reflection*

DFT - *Density Functional Theory*

HE - Hematoxilina e Eosina

COPDT/INPE – Coordenação de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.1 Objetivo Específicos	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA	17
3.2 MORFOLOGIA E DESEPITELIZAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA	18
3.2.1 Desepitelização da Membrana Amniótica Humana	20
3.3 OZÔNIO	20
3.4 ULTRASSOM	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 TIPO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS LEGAIS	24
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS	24
4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	24
4.4 ANÁLISES	29
4.4.1 Análise por FT-IR	29
4.4.2 Análise Histológica	30
4.4.3 Análise por MEV-FEG	30
5. RESULTADOS	31
5.1 ESTUDO PILOTO	31
5.2 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE OZÔNIO (O₃) DISSOLVIDO EM ÁGUA	32
5.3 ANÁLISE POR FT-IR	33
5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA	37
5.5 ANÁLISE POR MEV-FEG	38
5.6 CONFIRMAÇÃO DA HIPÓTESE LEVANTADA APÓS O EXPERIMENTO	40
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

A Membrana Amniótica Humana (MAH) é uma película fina, a qual representa a mais interna das membranas fetais e geralmente é descartada após o parto (Dadkhah Tehrani *et al.*, 2021). Este material é constituído a partir de três camadas histológicas: a epitelial, membrana basal e estroma, composto por fibroblastos e colágeno, também chamado de estroma (Mamede *et al.*, 2012).

A MAH apresenta em sua composição fibronectina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, lamininas, colágeno tipo I, III, IV, V, VI e VII, bem como fibroblastos e células-tronco pluripotentes em sua estrutura, que auxiliam no crescimento e reparo tecidual (Dcunha *et al.*, 2022). Em relação à participação da MAH no processo de imunomodulação da inflamação, o seu efeito tem sido relacionado a presença de interleucinas (IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10) e fatores de crescimento (Munoz-Torres *et al.*, 2023).

Nos últimos anos a aplicabilidade clínica da MAH tem sido fortemente estudada no campo da engenharia de tecidos. Devido a sua caracterização morfológica, bioquímica e respostas terapêuticas, despertando interesse de cientistas e engenheiros de biomateriais mundialmente (Zhang *et al.*, 2023).

A MAH é tipicamente utilizada no processo de cicatrização e redução da dor em feridas (Vaheb *et al.*, 2020). Um estudo recente realizado por Fitriani *et al.*, (2023), apresenta relatos de seu uso no desenvolvimento de biomateriais para correção de alterações dérmicas, na formação de tecido vivo para administração de medicamentos, no tratamento de epidermólise bolhosa, na reconstituição da uretra, regeneração em casos de calcifilaxia e cicatrização de tendões. Adicionalmente, existem evidências promissoras do seu uso em cirurgia oftalmológica, cardíaca e do fígado (Doudi *et al.*, 2022), regeneração óssea (Etchebarne *et al.*, 2021) e terapia do câncer (Jahanafrooz *et al.*, 2023).

Para uso clínico, a MAH precisa ser devidamente processada com técnicas adequadas de desinfecção/esterilização para remoção de possíveis patógenos (Leal-Marín *et al.*, 2021), que na maioria das vezes rompem as cadeias de polipeptídeo, comprometendo a integridade e a função da membrana (Tzaphlidou, 2002). Posteriormente, este material deve ser preservado por criopreservação, congelamento a seco, secagem ao ar e em alguns casos deve ser submetido ao

processo de desepitelização. O uso da membrana desepitelizada promove maiores taxas de proliferação e diferenciação celular (Leal-Marín *et al.*, 2021). Para algumas aplicações, como na área oftalmológica, a desepitelização da MAH é um passo fundamental do seu processamento (Munoz-Torres *et al.*, 2023; Mao *et al.*, 2023).

O processo de desepitelização pode ser realizado com o uso de tripsina que, por sua vez, rompem as ligações peptídicas das proteínas ou com dispase; ambas causam a completa remoção do epitélio e da membrana basal (Melo, *et al.*, 2007; Echarte *et al.*, 2022). Outro método bastante utilizado neste processo é a partir da utilização do Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid* - EDTA), que mantém áreas com epitélio intacto e destrói parcialmente a membrana basal (Melo, *et al.*, 2007). Além disso, protocolos livres de detergente, ou a utilização de detergentes não iônicos, como o Triton X-100, podem ser efetivamente utilizados para a desepitelização da MAH (Ashouri *et al.*, 2022; Niknejad *et al.*, 2008).

Awoyama *et al.*, (2022), conduziram uma pesquisa em que foi empregado um sistema hidrodinâmico desenvolvido com água ozonizada para desinfetar MAH. Os dados revelaram que além de desinfetar eficientemente o biomaterial, um período de 15 min de ozonização (5,85 mg/cm²) foi suficiente para provocar pequenas alterações morfológicas na camada epitelial cúbica, sem alterações significativas no *scaffold* da MAH, sendo assim, a utilização desta técnica tem potencial promissor para ser empregada na desepitelização de MAH.

O gás ozônio (O₃) é a forma alotrópica do Oxigênio (O₂) e possui um grande potencial como agente oxidante. Quando o gás é dissolvido na água as ligações da molécula de O₃ são quebradas e, são geradas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que reagem com compostos orgânicos e inorgânicos (Egorova *et al.*, 2015; Bayarri *et al.*, 2021; Passos *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2023). Quando utilizado estado gasoso no tecido epitelial, é visto que o O₃ altera a estrutura da membrana das células (Albright; Guttenberg; Tighe, 2022). Um fato importante, que favorece a interação do O₃ com a MAH, é que os processos de oxidação não rompem as ligações entre os grupos amidas das proteínas (Cataldo, 2006).

Atualmente, assim como o O₃, o ultrassom tem sido utilizado no processamento de materiais biológicos, devido à geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e EROs, como HO e HO₂, que agem na degradação e inativação de microrganismos (Matafonova; Batoev, 2020). Os efeitos apresentados ocorrem devido ao mecanismo

do ultrassom na água. Uma corrente elétrica, sob condição alternada com uma frequência cíclica atuando em um cristal piezolétrico, gera ondas mecânicas (He *et al.*, 2022). Por meio da propagação das ondas sonoras, ocorre um efeito chamado de cavitação (Li, Zou, Qin, 2022), que gera microbolhas que colapsam em altas pressões e temperatura, esta tem a capacidade funcional de atuar nos tecidos, causando o aumento da permeabilidade da membrana celular (Chowdhury *et al.*, 2020), principalmente em células endoteliais (Karthikesh, Yang, 2021). Em contraste, a ação do ultrassom de baixa frequência (24–40 kHz) possibilita a remoção de elementos sanguíneos e desepitelização da MAH (Milyudin *et al.*, 2023).

Motivados pelas pequenas alterações morfológicas que o uso de água ozonizada causa na camada epitelial observadas por Awoyama *et al.*, (2022) e pelo potencial do ultrassom em termos de desepitelização da MAH mostrado por (Milyudin *et al.*, 2023), este estudo utilizou o sistema desenvolvido por Heinzelmann *et al.*, (2024), em que as técnicas podem ser usadas separadamente ou combinadas. As propriedades bioquímicas foram avaliadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy-FT-IR*) e as estruturas morfológicas por histologia e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de alta resolução com emissão de campo (*Field Emission Gun - FEG*).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ◆ Avaliar se a água ozonizada e ultrassom causa desepitelização da MAH.

2.2 Objetivos Específicos

- ◆ Caracterizar a composição, estruturas e superfície da Membrana Amniótica Humana utilizando as técnicas FT-IR, histologia e MEV-FEG.
- ◆ Analisar a composição, estrutura e superfície da MAH após processamento com água ozonizada e ultrassom combinados e isolados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA

A MAH é composta por tecido extraembrionário, com uma face fetal, denominada de placa coriônica com superfície lisa e brilhante, anatomicamente volta-se para a cavidade uterina e outra face materna definida de decíduas (Şapte *et al.*, 2017).

A MAH desempenha um papel fundamental no desenvolvimento embrionário, fornecendo um ambiente protegido para o feto em desenvolvimento. A MAH se origina a partir da cavidade amniótica, que é uma expansão do saco vitelínico embrionário. À medida que o embrião se desenvolve, o âmnio envolve o feto, formando uma cavidade amniótica preenchida de líquido amniótico, que fornece proteção mecânica, regulação da temperatura e ambiente hidratado para o desenvolvimento fetal (Moore *et al.*, 2016).

Além de envolver o feto, a MAH desempenha um papel crucial na proteção contra infecções e lesões mecânicas durante o desenvolvimento fetal. A presença de uma membrana intacta é vital para garantir o crescimento e o desenvolvimento adequado do feto, uma vez que ela atua como uma barreira física e imunológica contra potenciais patógenos, devido a sua constituição (Barros, 2015).

Após o parto, a MAH é descartada, contudo, devido as suas propriedades bioquímicas e mecânica, apresenta resultados promissores para utilização clínica. A MAH apresenta células-tronco e matriz extracelular, é rica em componentes como colágeno, além da presença de fatores de crescimento, citocinas e proteínas antimicrobianas (Mamede *et al.*, 2012).

Tradicionalmente, a MAH é utilizada na reconstituição da pele em casos de lesão e de córnea, contudo, caminha para novas aplicações, como distribuição de medicamentos, injeções, em pó, regeneração muscular, cartilagens e tendões (Elkhenany *et al.*, 2022) e em gotas na oftalmologia (Lacorzana, 2020). Se destaca ainda por outras aplicações clínicas, incluindo reparo cardíaco, reconstrução neurológica, remodelação óssea e regeneração hepática (Hua; Zhou, 2009).

As células-tronco derivadas de MAH, distingue-se em células-tronco mesenquimais amnióticas humanas, células-tronco epiteliais amnióticas humanas e devido as suas respostas clínicas, mostram vantagens significativas sobre outras

células-tronco, o que é promissor para a terapia celular em várias doenças (Liu *et al.*, 2021).

A matriz extracelular da MAH exibe uma característica estrutural em forma de um andaime (*scaffold*), o que é favorável para o reparo tecidual e ainda pelos vários tipos de proteínas nela existente, como colágenos, lamininas e fibronectinas, que faz com que as células mesenquimais se fixem à matriz (Farhadihosseinabadi *et al.*, 2018).

3.2 MORFOLOGIA E DESEPITELIZAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA

A Figura 1 mostra uma representação esquemática da MAH, onde é possível observar suas três camadas estruturais: camada de epitelial, membrana basal e estroma, esta última formada pela camada compacta, de fibroblastos e esponjosa (Milyudin *et al.*, 2023).

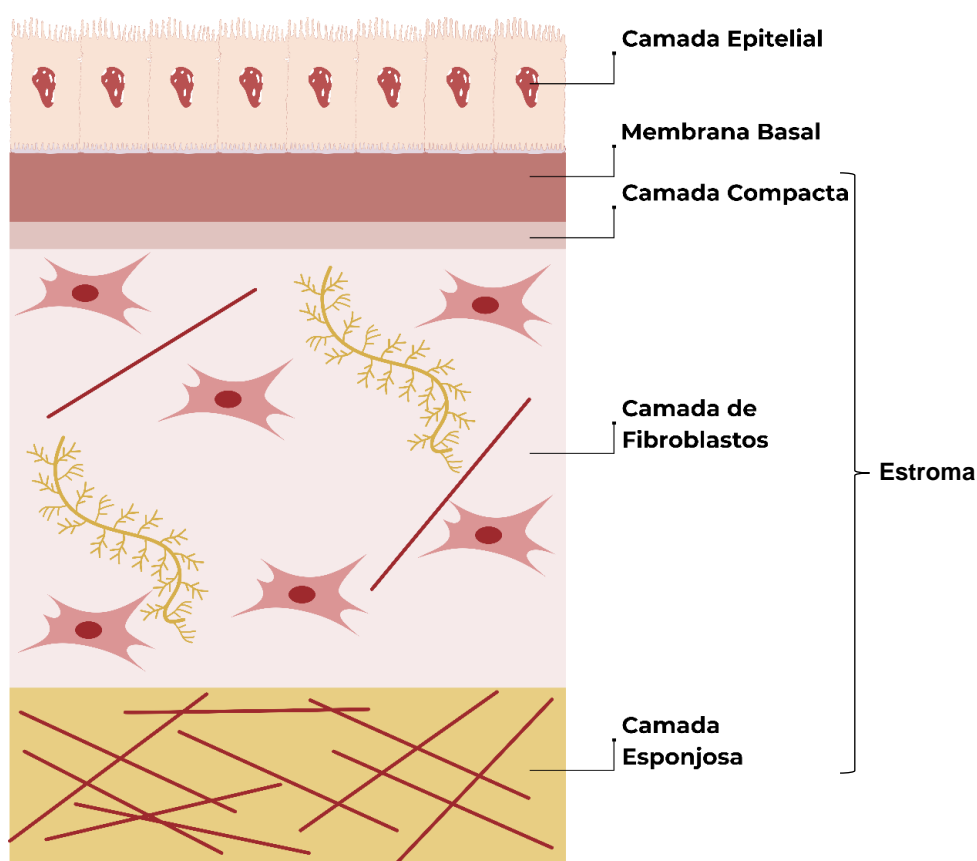


Figura 1. Representação das camadas da Membrana Amniótica Humana.

Fonte: Própria do autor.

As células epiteliais da MAH estão localizadas no âmnio placentário do feto (Ji; Yang, 2022) e sua morfologia varia conforme a sua localização. Na porção central da MAH as células são principalmente cuboides, com a presença de microvilosidades curtas e espessas projetando-se para o líquido amniótico. Nas áreas intermediárias, as células diferem-se em cúpula, com grande quantidade de microvilos na borda basal (em comparação a área central). Nas áreas periféricas, as células apresentam-se em formato colunar com microvilosidades longas e finas. Já as áreas refletidas, dispõem-se de células em forma de cúpula com microvilosidades achatadas (Basile *et al.*, 2023).

Interposta à camada epitelial, a membrana basal apresenta características singulares com a capacidade de manter uma barreira semipermeável, controlando o fluxo de substâncias entre o líquido amniótico e a camada subjacente. Durante a gestação, essa característica é essencial para a homeostase fetal, uma vez que regula a difusão de nutrientes e metabólitos, além de proteger o feto contra patógenos internos e externos (Hilmy; Yusof, 2017).

A membrana basal é uma fina camada avascular que atua como a interface primordial entre o epitélio e as camadas subjacentes (Doudi *et al.*, 2022). É composta por colágeno do tipo III, V, IV e VII, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e elastina, conferindo-lhe características de força e permeabilidade seletiva. Além disso, possui um conjunto único de proteínas de ancoragem, incluindo laminina (I e V) e fibronectina, que desempenham um papel crucial na manutenção da integridade e função da membrana (Iranpour *et al.*, 2018).

As camadas subjacentes, também conhecidas como estroma, são formadas pela camada compacta de característica fina e resistente pela presença de colágeno tipo I, III, V e VI e fibronectina; a camada de fibroblastos, que contém colágeno tipo I, III, e VI, lamina, fibronectina e células de Hoffbauer; já a camada esponjosa encontra-se disposta em uma rede de fibrilas e muco, constituída por colágeno tipo I e II e ao nível topográfico está em contato com a córion e, devido a sua característica viscoelástica, age na proteção contra traumas mecânicos na MAH (Hilmy; Yusof, 2017).

3.2.1 Desepitelização da Membrana Amniótica Humana

O processo de desepeitização é a remoção da camada de células epiteliais da MAH. Ainda não é exatamente definido na literatura as implicações da remoção da camada epitelial (Riau *et al.*, 2010). Contudo, é comumente realizado para aplicações na oftalmologia (Melo *et al.*, 2007), reparo do sistema nervoso periférico (Yilmaz *et al.*, 2023), na regeneração óssea (Miller; Korn; Miller, 2021) e desenvolvimento de enxertos na engenharia de tecidos (John *et al.*, 2019).

Tradicionalmente são utilizados métodos químicos para a desepeitização. O método que proporciona uma retirada por completo da camada epitelial é o com dispase e tripsina (Melo *et al.*, 2007), que acarreta um afrouxamento do tecido conjuntivo mesenquimal (John *et al.*, 2019). Já o EDTA, não remove o epitélio por completo e ainda altera a estrutura da membrana basal. Adicionalmente, os três métodos apresentados, necessitam de uma intervenção mecânica para a desepeitização (Melo *et al.*, 2007).

Destaca-se ainda, os métodos utilizando ureia, etanol, termolisina, tampão hipotônico, dodecil sulfato de sódio e nuclease. Contudo, estes diferentes métodos apresentam modificações estruturais e biológicas na MAH (Ferency; Souza, 2020). Alguns métodos, além de comprometer a membrana são demorados e de custo elevado (Bandeira *et al.*, 2019). Destacando que um método eficiente seria aquele que mantivesse a matriz extracelular da membrana intacta (Ferency; Souza, 2020).

3.3 OZÔNIO

Os primeiros relatos de O₃ datam de 1770, quando Priestley (Inglaterra) e Scheele (Suécia) iniciaram estudos sobre as propriedades do ar, realizando a separação deste em duas partes distintas. Em 1776, Lavoisier identificou o gás como oxigênio (O₂). Em 1785, Van Marum conduziu experimentos nos quais faíscas elétricas foram emitidas em presença de O₂, resultando em um odor característico e uma forte reação com o mercúrio. Em 1840, Christian Friedrich Schönbein identificou que o odor não era derivado da eletricidade, mas sim da substância resultante do processo elétrico, definindo-a como O₃ (Stolarski 2001).

O ozônio (O₃) é formado quando uma molécula de O₂ é dissociada, ou seja, dividida em dois átomos de oxigênio individuais (O), por meio de um processo que envolve a quebra da ligação dupla covalente entre os átomos. Esses átomos de

oxigênio isolados, que são altamente reativos, podem se combinar com uma molécula de O_2 para formar O_3 . O resultado é uma molécula de ozônio, que possui uma estrutura trigonal, onde um dos átomos de oxigênio está ligado a outros dois átomos de oxigênio por ligações covalentes. Essas ligações resultam em uma molécula com características distintas, como alta reatividade e instabilidade, que tornam o O_3 um forte agente oxidante (Bocci, 2005).

A reação do O_3 com a água (H_2O) ocorre em várias condições, mas uma das interações principais é a formação de radicais hidroxila (OH), especialmente em soluções aquosas. O ozônio, sendo uma molécula altamente reativa e oxidante, reage com a água em um processo que pode envolver a decomposição do O_3 . Em meio aquoso, o ozônio pode se decompor O_2 e gerar OH, uma espécie química extremamente reativa que é capaz de oxidar uma ampla variedade de compostos. A equação geral que descreve esse processo é: $O_3 + H_2O \rightarrow O_2 + 2 OH$. Esses radicais hidroxila formados são importantes em diversas reações químicas, pois são poderosos agentes de oxidação, capazes de degradar substâncias orgânicas e inorgânicas de maneira eficiente (MAHmoud; Freire, 2007; Wang *et al.*, 2022).

Devido à alta capacidade de reagir com outras substâncias, o O_3 é uma molécula com várias aplicabilidades (Romary *et al.*, 2023). Como na desinfecção de superfícies de materiais hospitalares (Abinaya; Muthu Kumar; Ahila, 2018; Smith *et al.*, 2017).

Já no tecido epitelial, é possível perceber que o O_3 em estado gasoso gera efeitos diretos na permeabilidade epitelial (Albright; Guttenberg; Tighe, 2022), assim como apoptose das células (Murphy, *et al.*, 2014; Romary, *et al.* 2023).

Devido à ação do O_3 no tecido epitelial, é possível perceber alterações estruturais nas células, como observado no estudo de Awoyama *et al.* (2022), o que torna o método promissor para a Engenharia Biomédica. Uma vez que a água ozonizada exerce efeito citotóxico nas células epiteliais (Huth *et al.*, 2006), essas alterações podem ter implicações importantes na manipulação de tecidos biológicos. Contudo, vale ressaltar que mesmo com as alterações epiteliais, o O_3 não rompe as ligações amidas das proteínas, conforme descrito por Cataldo (2006).

3.4 ULTRASSOM

A descoberta do efeito piezoelétrico é um marco fundamental na história da ciência e da tecnologia. Em meados do século XVIII, os cientistas Pierre e Jacques

Curie observaram que determinados cristais, como o quartzo, geravam uma tensão elétrica quando submetidos a pressão mecânica. Este fenômeno, conhecido como efeito piezoelétrico, abriu portas para inúmeras aplicações em diversos campos, incluindo, a tecnologia de ultrassom. O efeito piezoelétrico é a base fundamental dos transdutores no ultrassom, permitindo a conversão de pulsos elétricos em ondas sonoras e vice-versa, de alta frequência, estão além do alcance da audição humana, acima de 20 kHz (McCarus; Parnell, 2019).

Quando uma corrente elétrica alternada é aplicada a um transdutor piezoelétrico, ele entra em vibração, gerando ondas acústicas na mesma frequência com relação à corrente elétrica aplicada ao transdutor. A propagação dessas ondas no meio é regida por princípios de acústica, incluindo velocidade, frequência e atenuação. A velocidade de propagação das ondas ultrassônicas depende das características do meio de propagação (He *et al.*, 2022).

No meio líquido ocorre o processo de cavitação, caracterizado pela formação, crescimento e colapso de microbolhas devido à variação da pressão local. A cavitação é desencadeada pelo intenso ciclo de compressão e rarefação das ondas sonoras. Quando uma onda de pressão negativa provoca a expansão local do líquido, bolhas de vapor ou gás podem se formar, e quando a pressão se torna positiva novamente, essas bolhas colapsam rapidamente, gerando intensas forças de cavitação. Assim as ondas mecânicas geram um efeito vibracional, que favorecem a remoção de material sedimentado em superfícies em geral (Li, Zou, Qin, 2022).

A propagação das ondas acústicas e a cavitação, provocam alterações de pressão e assim a formação de microbolhas que no seu interior são gerados radicais O (átomos de oxigênio), radicais OH. Estas, aumentam até implodirem. Como resultado, em microssegundos, ocorre um aumento da temperatura cerca de 6.500 K e aumento da pressão (Yasui, 2022).

As microbolhas, decorrentes da cavitação aumenta eficientemente a permeabilidade da membrana celular, que ocorre pela criação temporária de poros nas membranas celulares por um fenômeno chamado sonoporação (Chowdhury, *et al.*; 2020; Wen, *et al.*; 2023), que ocorre facilmente nas células endoteliais (Karthikesh, Yang, 2021).

É demonstrado que o ultrassom causa ruptura tecidual (Teenan *et al.*; 2022). A MAH, quando exposta ao ultrassom de baixa frequência, leva à destruição completa

das estruturas celulares, com uma desepitelização significativa com uma leve descamação da membrana basal (Milyudin *et al.*, 2023).

Uma pesquisa que empregou um sistema hidrodinâmico utilizando água ozonizada e ultrassom revelou resultados promissores na eliminação de biofilme da superfície de instrumentos. A ação hidrodinâmica do sistema, combinada com a propagação de ondas acústicas e cavitação geradas pelo ultrassom, facilitou a remoção de microrganismos da superfície. Além disso, a presença de água corrente ozonizada contribuiu para a oxidação da matéria orgânica (Heinzelmann, 2024).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TIPO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS LEGAIS

A presente pesquisa trata-se de um estudo experimental *in vitro* e comparativo. O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi com o parecer nº 3.984.423, CAAE: 289370020.0.0000.5492, aprovou a realização do estudo. Que seguiu todas as determinações instituídas na Resolução da Diretoria Colegiada n.190, de 19 de julho de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que Determina Normas Técnicas para o funcionamento dos bancos de sangue de cordão umbilical e placentário (Brasil 2003).

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

A coleta da membrana foi realizada na Santa Casa de Misericórdia de Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil. Quatro MAH foram coletadas, uma para cada etapa do estudo. As MAH eram frescas obtidas assepticamente a partir de cesarianas de doadoras soronegativas (sífilis, hepatite B, toxoplasmose, HIV) com intervalo de idade entre 28 e 30 anos, doadas de forma voluntária para a pesquisa após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE.

O material foi acondicionado em um frasco de vidro contendo solução fisiológica à 0,9% (NaCl, 0.9%), e posterior armazenamento em um recipiente térmico com temperatura entre 10 e 15 °C e transportado para o Laboratório de Desinfecção e Esterilização do Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITÉ), em São José dos Campos, São Paulo, Brasil. A MAH foi lavada manualmente em solução estéril, por 10 vezes, para remoção de possíveis resíduos biológicos.

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental foi realizado em quatro etapas, conforme descrito na Figura 2. A etapa I foi realizada para determinar o tempo do experimento. Para isso, foram segmentadas sete amostras, uma amostra controle e seis que foram processadas no sistema envolvendo água ozonizada combinada com ultrassom por diferentes tempos (10, 20, 30, 40, 50 e 60 min). A etapa II compreendeu o primeiro experimento. Aqui, um MAH foi dividido em quatro grupos de amostras avaliados em triplicata: controle/ *in natura* (IN), processada com ultrassom em meio líquido (US),

processada com água ozonizada (O₃) e processada com água ozonizada combinada com ultrassom (US_O₃). A etapa III foi realizada para confirmar os resultados; para isso, foi utilizado um MAH, seguindo os mesmos passos utilizados na etapa II. A etapa IV foi realizada usando oxigênio para confirmar a hipótese. A análise histológica foi realizada para verificar se os efeitos do O₂ eram semelhantes aos do O₃; nesta etapa, um MAH foi segmentado em três amostras: controle/natural (IN_C), processada com O₂ e ultrassom (O₂_US) e processada com ultrassom em meio líquido (US_C).



Figura 2. Etapas do protocolo do experimento.

Fonte: Própria do autor.

Foi utilizada uma mesma região anatômica da membrana para todos os experimentos, conforme recomendado por Weidinger *et al.*, (2021). Foram cortados com lâminas estéreis de bisturis com aproximadamente 2 cm de largura e 6 cm de comprimento, totalizando uma área aproximada de 12 cm². As amostras foram fixadas em um suporte confeccionado de policloreto de vinila (PVC) estruturado com uma base (3), quatro hastes (1) que contêm parafuso e arruela em aço inox (4) e membrana de borracha a base de latex (5) para fixação da MAH nos quatro espaços (2) (**Figura 3**).



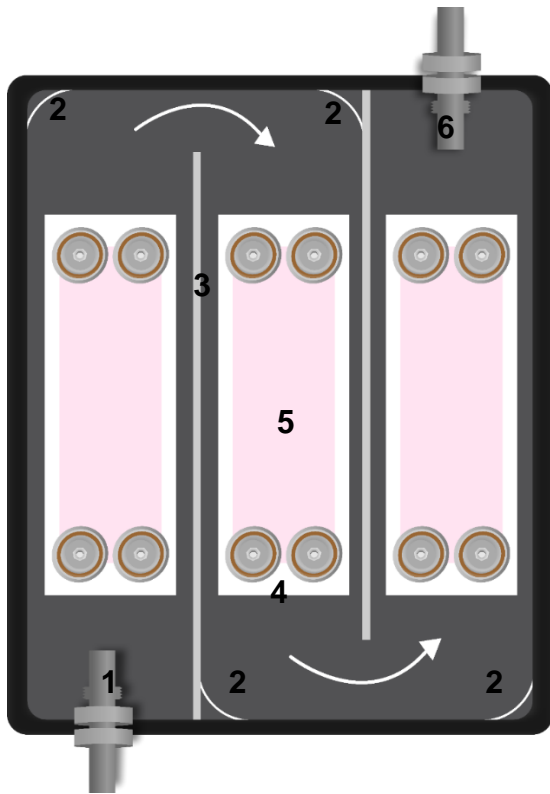
Legenda: (1) Hastes. (2) Espaço de fixação da MAH. (3) Base de contato com o reservatório. (4) Parafuso e arruela. (5) Borracha para fixação.

Figura 3. Suporte da Membrana Amniótica Humana.

Fonte: Própria do autor.

O experimento foi conduzido no interior de capela com exaustão. O reservatório, foi preenchido com 700 mL de água destilada entre 17 e 20 °C, para realização da ozonização prévia foi realizada por 10 min até alcançar um nível de concentração de 3,0 mg/L de O₃ dissolvido na água (exceto para a amostra US), encontrado na curva de concentração apresentada nos resultados.

Após esse período, os grupos O₃ e US_O₃ foram submersos e posicionados no centro do reservatório (**Figura 4**). Os grupos foram processados separadamente, por 55 minutos, com base no que foi determinado na etapa I do protocolo experimental.

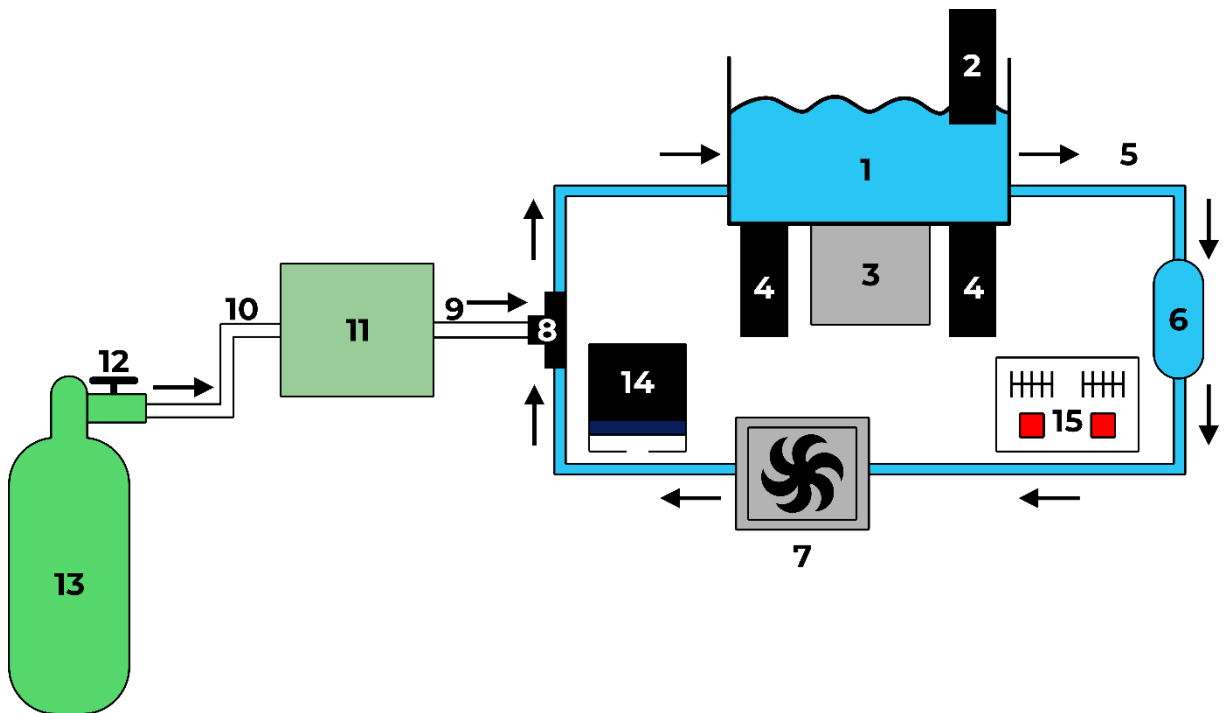


Legenda: (1) Entrada de água ozonizada. (2) Placas de PVC curvada. (3) Separação dos compartimentos do reservatório. (4) Suporte da Membrana Amniótica Humana. (5) Amostra da Membrana Amniótica Humana. (6) Saída de água ozonizada.

Figura 4. Vista superior do reservatório principal, com o posicionamento da amostra.

Fonte: Própria do autor.

Neste experimento, foi utilizado o equipamento descrito no estudo realizado por Heinzelmann *et al.*, (2024). Este, consiste em um sistema hidrodinâmico combina água ozonizada e ultrassom. O sistema possui um gerador de ozônio (modelo MS3G, MS Ltda, Brasil), conectado a um cilindro de oxigênio com vazão ajustada para ¼ L/min, resultando em uma concentração de 48 mg/L. O O₃ é dissolvido em 700 mL de água destilada no reservatório do sistema, utilizando um injetor Venturi integrado ao equipamento. Acoplado na base do reservatório principal, encontra-se um cabeçote gerador de ultrassom com cristal piezelétrico (40 KHz, 50 W acústicos) (**Figura 5**).



Legenda: (1) Reservatório principal, (2) sensor de temperatura, (3) cabeçote de ultrassom com cristal piezoelétrico, (4) ventoinhas, (5) mangueira de fluxo da água ozonizada, (6) bomba centrífuga, (7) sistema de refrigeração com placa Peltier, (8) injetor Venturi, (9) mangueira de fluxo do gás de ozônio, (10) mangueira de fluxo do oxigênio, (11) gerador de ozônio, (12) válvula reguladora de fluxo, (13) cilindro de oxigênio, (14) controle eletrônico para ativar e controlar o sistema, (15) controle eletrônico do cabeçote de ultrassom com cristal piezoelétrico.

Figura 5. Representação esquemática do sistema hidrodinâmico com ozônio e ultrassom.

Fonte: Própria do autor, baseado no estudo de Heinzelmann *et al.*, (2024).

Por se tratar de um sistema hidrodinâmico, vale ressaltar que a velocidade média da água que fluiu no reservatório principal foi de 2 cm/s. Valor calculado pelo ajuste da vazão da bomba centrífuga (Q) de $1300 \text{ cm}^3/\text{min}$ e pela área do reservatório principal de $10,5 \text{ cm}^2$.

$$Q[\text{cm}^3/\text{min}] = A[\text{cm}^2] \times V[\text{cm}/\text{min}]$$

$$V = 1300 \text{ cm}^3/\text{min}^{-1} / 10,5 \text{ cm}^2$$

$$V = 2 \text{ cm/s}$$

Para as amostras amostra O₃ e O₃ + US, a vazão do cilindro de oxigênio de 0,25 L/min e a concentração de O₃ = 48 mg/cm² (O₃), a taxa de produção de ozônio (TO₃) foi determinada conforme o cálculo abaixo:

$$TO_3 = C[\text{mg/L}] \times Q[\text{L/min}]$$

$$TO_3 = 48 \text{ mg/L} \times 0,25 \text{ L/min}$$

$$TO_3 = 12 \text{ mg/min}$$

Considerando a taxa de produção de O₃ = 12 mg/min e o tempo de exposição ao ozônio de 55 minutos, a quantidade de O₃ em massa entregue foi de:

$$m[\text{mg}] = TO_3 \times T[\text{min}]$$

$$m = 12 \text{ mg/min} \times 55 \text{ min}$$

$$m = 660 \text{ mg}$$

Levando em consideração que a MAH foi cortada com uma área de 12 cm², a dosagem de O₃ aplicada por cm² foi:

$$D[\text{mg/cm}^2] = m[\text{mg}] / A[\text{cm}^2]$$

$$D = 660 \text{ mg} / 12 \text{ cm}^2$$

$$D = 55 \text{ mg/cm}^2$$

Ao finalizar cada experimento, as amostras foram preparadas para posterior análise, assim como descrito a seguir.

4.4 ANÁLISES

4.4.1 Análise FT-IR

Após o término do processamento das amostras de MAH, elas foram encaminhadas para o Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMar), da Universidade Estadual Paulista (Unesp), de São José dos Campos, São Paulo, Brasil, onde foram realizadas as análises a partir de FT-IR. Os espectros de FT-IR foram obtidos pelo espectrômetro PerkinElmer FT-IR/NIR *Spectrometer Frontie* na faixa espectral de 400 a 4000 cm⁻¹, com 45 varreduras e uma resolução espectral de 4 cm⁻¹, com acessório *Universal Attenuated Total Reflection* (UATR). Os espectros foram obtidos em quintuplicata e determinada a mediana, para posterior análise.

4.4.2 Análise Histológica

Para a análise histológica, as amostras foram fixadas com solução de formol 10% e em seguida desidratadas, diafanizadas, impregnadas e incluídas em blocos de parafina. A segunda parte da preparação do material, foi a realização do corte com um micrótomo rotativo e corado com hematoxilina e eosina (HE). Para visualização das lâminas, foi utilizado microscópio óptico (*Opticam® Microscopy Technology*) e as imagens obtidas a partir de software OPTHD®.

4.4.3 Análise por MEV-FEG

Após o processamento, as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 25% em tampão fosfato 0,2 M e água destilada. Em seguida, foram mantidas em uma temperatura entre 2 e 8°C por 48 horas até análise. Finalizado o período, cada amostra passou por três lavagens, com duração de 30 minutos, empregando-se uma solução na proporção 1:1 de fosfato de sódio bibásico, fosfato de sódio monobásico e água destilada. Na sequência, a desidratação foi realizada em sete etapas, com porcentagens progressivas de etanol, iniciando com 30% e finalizando com 100% (**Tabela 1**).

As amostras foram fixadas em suporte com fita dupla face de carbono e metalizadas com uma película de ouro (Quorum Q150R ES) no Departamento de Engenharia Mecânica do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA). As micrografias foram obtidas em equipamento MEV-FEG (Tescan Mira 3), junto a Coordenação de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (COPDT/INPE).

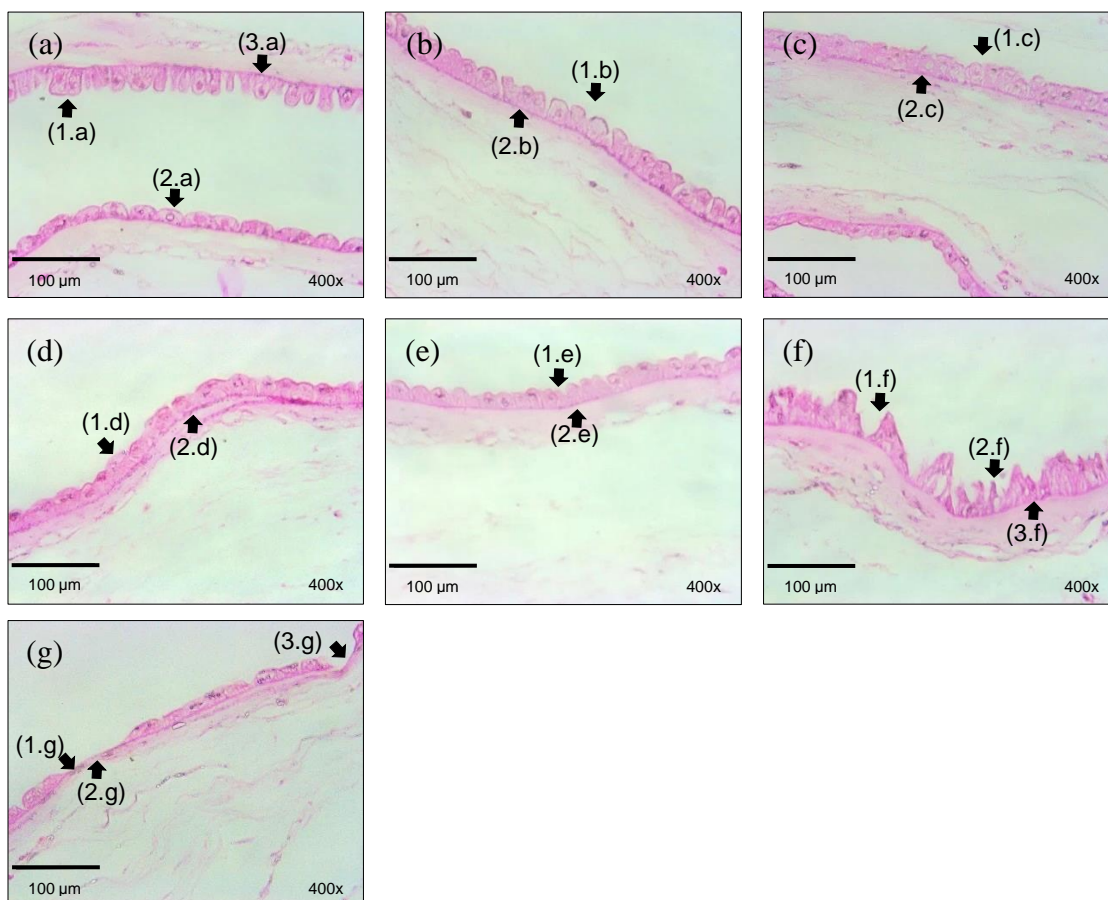
Tabela 1. Detalhamento do processo de desidratação das amostras.

Etapa	% de álcool	Tempo
Primeira	Etanol 30%	10 min
Segunda	Etanol 50%	10 min
Terceira	Etanol 70%	10 min
Quarta	Etanol 90%	10 min
Quinta	Etanol 90%	20 min
Sexta	Etanol 100%	10 min
Sétima	Etanol 100%	20 min

5. RESULTADOS

5.1 ESTUDO PILOTO

Como mencionado nos materiais e métodos, para determinação do tempo, foi realizado um estudo piloto, cujo, resultados são apresentados na Figura 6. As amostras foram processadas no sistema com água ozonizada e ultrassom, em seis tempos com intervalo de 10 min.



Legenda: (a) Amostra-*In Natura*, (b) Amostra-10min. (c) Amostra-20min. (d) Amostra-30 min. (e) Amostra-40 min. (f) Amostra-50 min. (g) Amostra-60 min. As setas (1.a), (2.a), (1.b), (1.c), (1.d), (1.e), (2.f) e (1.g) indicam o tecido epitelial, as (1.f) e 3.g) a remoção das células epiteliais e as (3.a), (2.b), (2.c), (2.d), (2.e) (3.f) e (2.g) a membrana basal.

Figura 6. Imagens histológicas do estudo piloto em seis tempos distintos.

Fonte: Própria do autor.

Na Figura 6 (a) é possível perceber a integridade das células epiteliais colunares e cuboides na MAH por meio das setas (1.a) e (2.a) e na seta (3.a) a

presença da membrana basal. Na Figura 6 (b), na seta (1.b) nota-se as células epiteliais e na seta (2.b) a membrana basal inalteradas, assim como na Figura 6 (c) nas setas (1.c) e (2.c). Contudo, a partir da Figura 6 (d) a superfície das células epiteliais começa a perder sua estrutura, nas setas (1.d) e (2.d) é possível notar leves alterações. Assim como na Figura 6 (e) nas setas (1.c) e (2.c).

Na Figura 6 (f) o epitélio permanece presente em grande área da MAH. Contudo, perdeu as características morfológicas. Apresentou pequenas áreas com remoção das células epiteliais, assim como mostra a seta (1.f) e seta (2.f) mostra deformação no contorno da célula e a (3.f) preservação da membrana basal. Já na Figura 6 (g), a seta (1.g) mostra que o tecido epitelial ficou mais compacto, a seta (2.g) mostra a preservação da membrana basal e a seta (3.g) área com a remoção total do tecido epitelial.

No estudo piloto as amostras foram processadas simultaneamente a ação do O₃ e ultrassom, os dados obtidos a partir da análise histológica revelaram que a desepitelização começou a ocorrer em algumas regiões considerando os tempos, de 50 e 60 minutos. Neste sentido, foi determinado um tempo de 55 min para processamento da MAH.

5.2 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE OZÔNIO (O₃) DISSOLVIDO EM ÁGUA

A Figura 7 apresenta a curva de concentração do O₃ até 1200 s (20 min) de ozonização prévia. Contudo, no experimento foi utilizado um tempo determinado no estudo realizado por Heinzelmann *et al.*, (2024), que foi de 600 s (10 min), que alcançou um nível de concentração de O₃ de 3,0 mg/L. Na análise da curva de concentração, o coeficiente de determinação foi de $R^2 = 0,98$, apontando uma alta correlação entre o tempo e concentração de O₃.

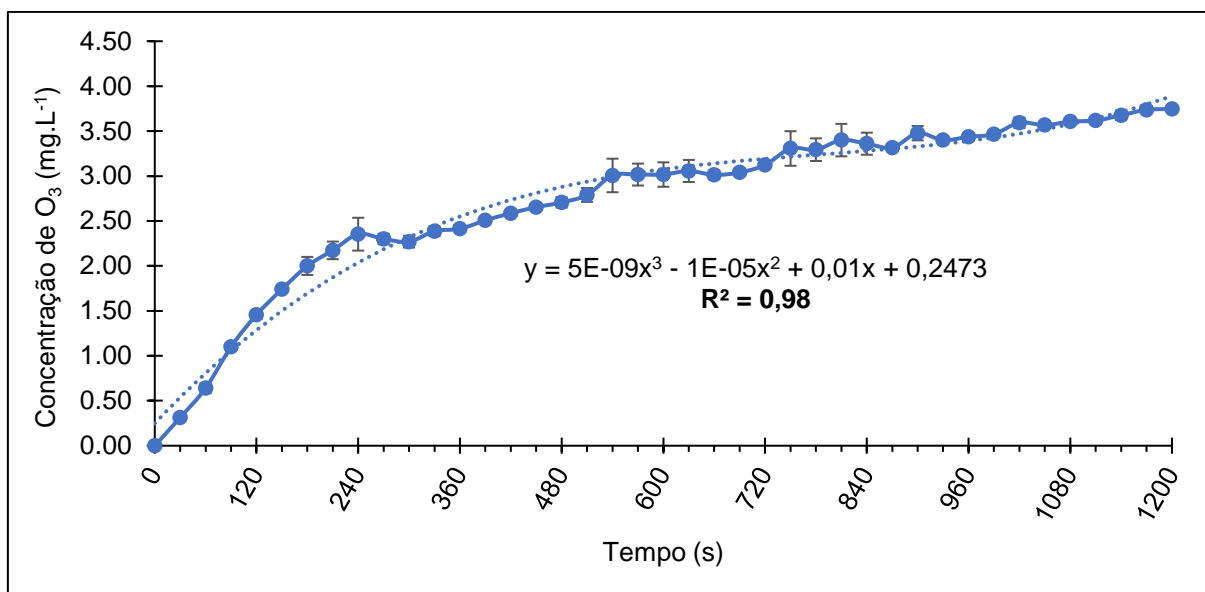


Figura 7. Curva de concentração de ozônio (O₃) dissolvido em água.

Fonte: Própria do autor.

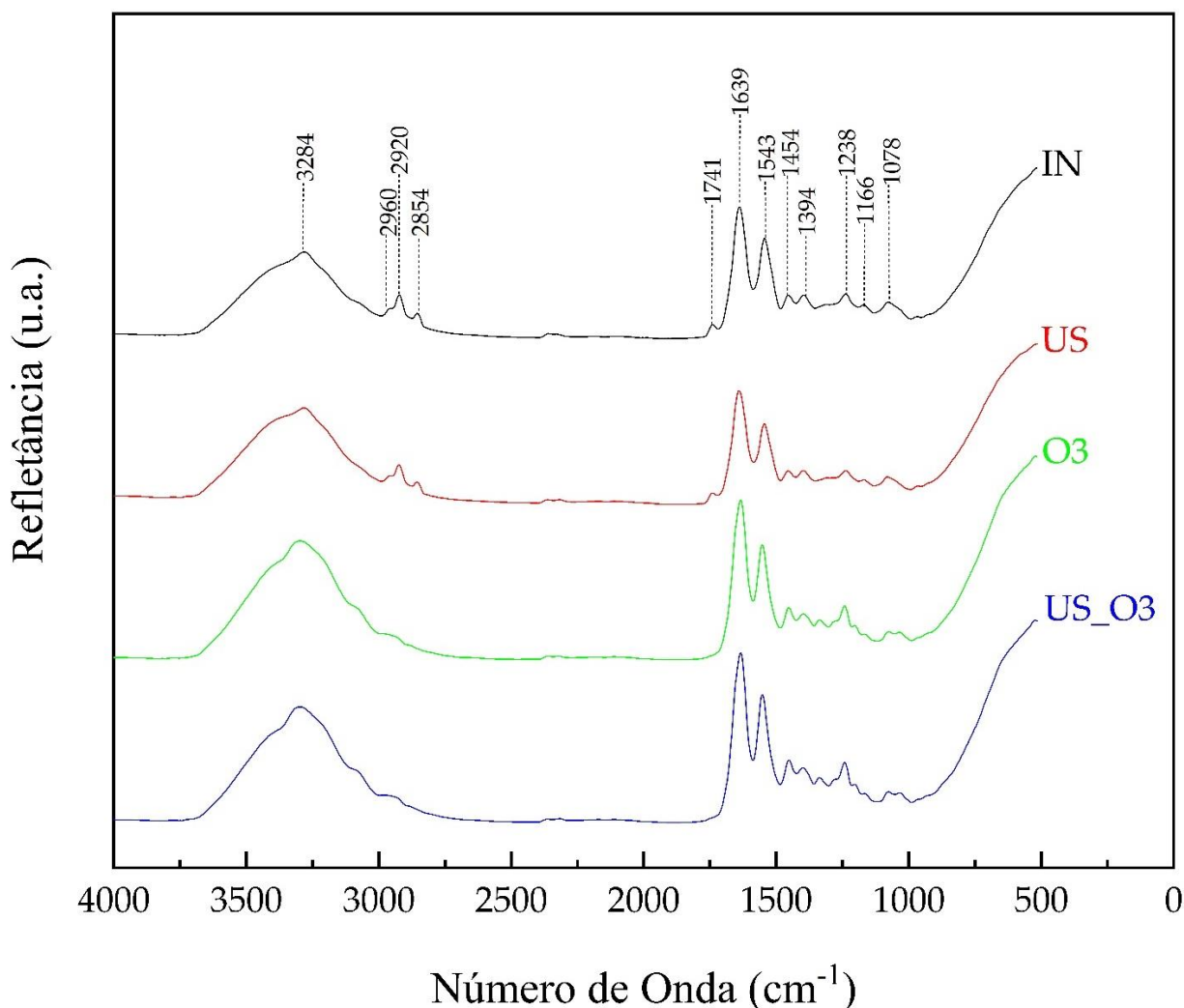
5.3 ANÁLISE POR FT-IR

Os espectros experimentais de FT-IR e a atribuição das bandas observadas estão mostradas na Figura 8. Os espectros exibiram similaridade, no entanto, mudanças sutis podem ser destacadas, como leves mudanças de banda e mudanças de intensidade representando a caracterização físico-química das amostras. A Figura 8, apresenta os valores atribuídos da amostra IN, que foram então são comparados com as outras amostras. A Tabela 2 apresenta as atribuições dos grupos funcionais e bandas principais no espectro MAH.

A Amida A é observada entre 3300–3310 cm⁻¹ que caracterizada pelo estiramento de NH (Sripriya, Kumar, 2016). No presente estudo, uma larga banda é observada em torno de 3284 cm⁻¹, com maior intensidade nas amostras O3 e O3_US, a amostra US apresentou uma similaridade com a IN.

Na região de 2960 cm⁻¹ é marcada pelo modo vibracional em estiramento assimétrico de CH₃ (Cavalu *et al.*, 2021) e em 2920 cm⁻¹ com estiramento assimétrico de CH₂, ambas caracterizam a presença de lipídios, ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, já a banda 2854 cm⁻¹ atribuída ao estiramento simétrico de CH₂ caracteriza apenas os lipídios (Talari *et al.*, 2017). No presente estudo, quando comparado a IN com a US, nota-se similaridade entre as duas, já na amostra O3 e US_O3, fica evidente que após o processamento no sistema

a intensidade da banda foi reduzida, assim como a banda 1741 cm^{-1} atribuída ao estiramento de C=O.



Legenda: IN-Controle/*in natura*. US-Processada com ultrassom em meio líquido. O3-Processada com água ozonizada. US_O3-Processada com água ozonizada associada ao ultrassom.

Figura 8. Espectros obtidos por FT-IR das amostras.

Fonte: Própria do autor.

A Amida I, em 1639 cm^{-1} é caracterizada pelo estiramento de C=O (Talari *et al.*, 2017; Ruiu *et al.*, 2020) e nas amostras as bandas mantiveram-se iguais. No espectro, a Amida II, que pode ser identificada nas bandas em 1543 cm^{-1} (Talari *et al.*, 2017) e atribuída ao modo de flexão do N-H e estiramento C-N (Cavalu *et al.*, 2021; Ruiu *et al.*, 2020), se manteve presente em todas as amostras, com intensidades próximas ao da IN, notavelmente permaneceu quase que inalterada. Assim como a banda 1394

cm^{-1} característica do grupo funcional das proteínas atribuída ao modo de abano de CH_3 (Talari *et al.*, 2017).

A Amida III, identificada no espectro em 1238 cm^{-1} (Sripriya, Kumar, 2016), é caracterizada pelo modo de estiramento de CN e flexão do NH (Grdadolnik 2002), além da contribuição do estiramento C-C e flexão C=O (Cavalu *et al.*, 2021). No presente estudo, a intensidade da amostra US manteve-se próxima da IN, enquanto nas amostras O3 e US_O3 foi observado um aumento da intensidade do pico. No espectro em torno de 1166 cm^{-1} nota-se o grupo funcional de colágeno (tipo I) atribuído ao estiramento de C-O, em 1078 cm^{-1} a banda referente aos ácidos nucleicos, glicolipídios e fosfolipídios e em 1078 cm^{-1} a banda é caracterizada pelo estiramento de PO_2 (Talari *et al.*, 2017). Quando comprado a amostra IN, as demais amostras não sofreram alterações, mantendo-se estáveis após a utilização do sistema.

Tabela 2. Atribuição dos grupos funcionais e principais bandas do espectro da MAH.

Grupo Funcional	$\omega(\text{cm}^{-1})$	Atribuições	Autor e ano
Amida A	3284	v NH	(Sripriya, Kumar, 2016; Talari <i>et al.</i> , 2017)
Lipídios, DNA e proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos	2960	v_a CH ₃	(Cavalu <i>et al.</i> , 2021; Talari <i>et al.</i> , 2017)
	2920	v_a CH ₂	(Talari <i>et al.</i> , 2017)
Lipídios	2854	v_s CH ₂	(Talari <i>et al.</i> , 2017)
Gordura e lipídeo	1741	v C=O	(Talari <i>et al.</i> , 2017)
Amida I	1639	v C=O	(Talari <i>et al.</i> , 2017; Roiu <i>et al.</i> , 2020)
Amida II	1543	sc NH / v C-N	(Cavalu <i>et al.</i> , 2021; Talari <i>et al.</i> , 2017; Roiu <i>et al.</i> , 2020)
Lipídios	1454	sc CH ₂	(Talari <i>et al.</i> , 2017)
Proteínas	1394	wag CH ₃	(Talari <i>et al.</i> , 2017)
Amida III	1238	v C-N / sc N-H / v C-C / sc C=O	(Sripriya, Kumar, 2016; Cavalu <i>et al.</i> , 2021; Grdadolnik 2002)
Colágeno (tipo I)	1166	v C-O	(Talari <i>et al.</i> , 2017)
Ácidos nucleicos, glicolipídios e fosfolipídios	1078	v PO ₂	(Talari <i>et al.</i> , 2017)

ω Número de onda. v-Estiramento. v_a -Estiramento assimétrico. v_s -Estiramento simétrico. sc-Tesoura (flexão). wag-Abano.

5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

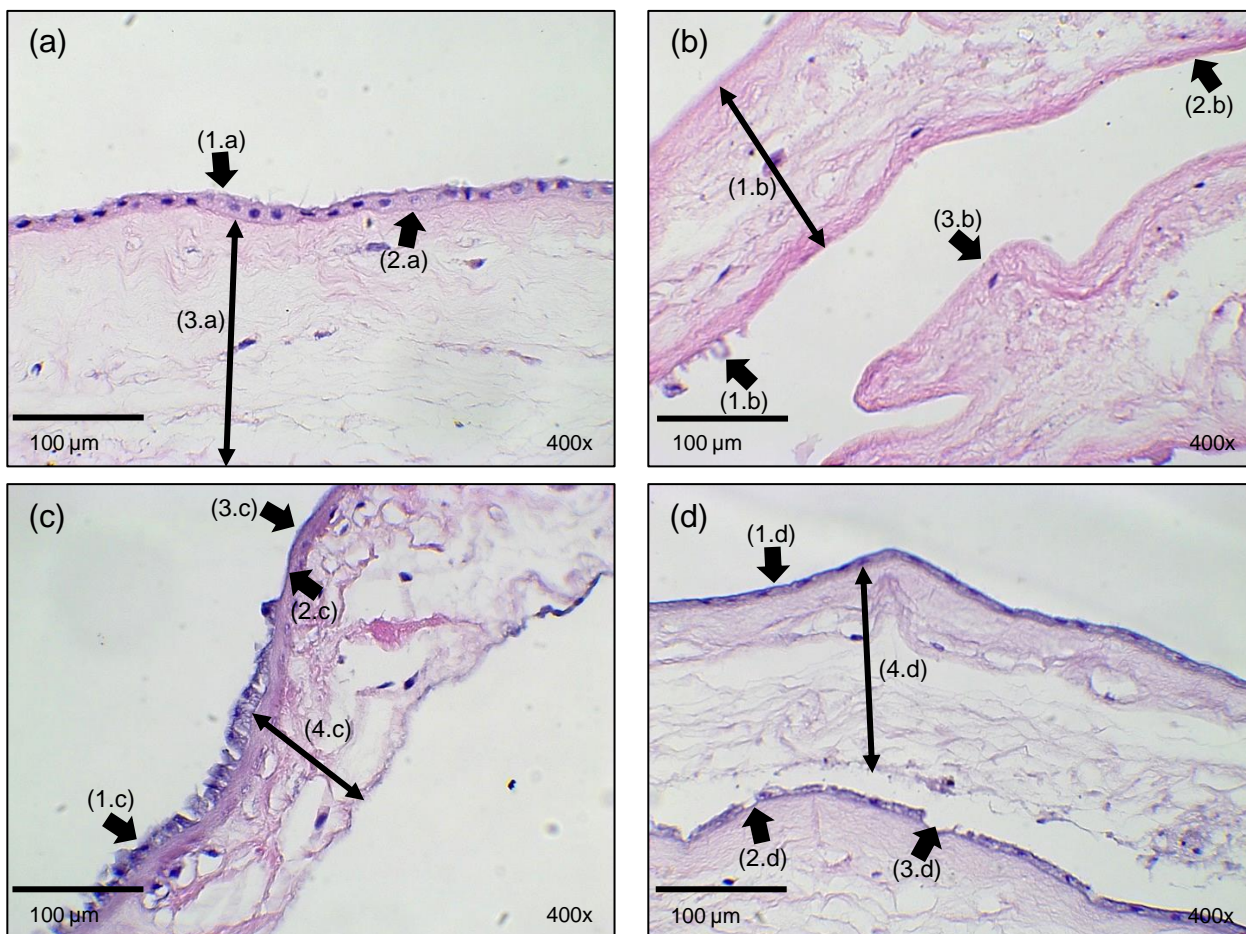
As imagens histológicas das amostras são apresentadas na Figura 9. É possível identificar as alterações estruturais da MAH após o processamento no sistema hidrodinâmico desenvolvido com água ozonizada e ultrassom, que são indicadas por meio de setas na Figura 9.

Na Figura 9 (a) da amostra IN é possível perceber a presença das junções celulares integras e células epiteliais no formato cuboide, indicada pela seta (1.a) aderidas umas às outras, a membrana basal intacta, indicada pela seta (2.a) e a integridade do estroma, com disposição do colágeno, indicado pela seta (3.a).

Quando analisada, a imagem histológica da amostra US na Figura 9 (b), nota-se na seta (1.b) que o estroma permaneceu denso, com aspecto próximo da amostra IN. As células epiteliais foram removidas quase que completamente e as restantes sofreram alterações significativas, indicadas na seta (2.b), com áreas de preservação da membrana basal indicado pela seta (3.b) e uma grande área do tecido que sofreu o processo de desepitelização, indicado pela seta (4.b). Assim, é possível perceber que o efeito mecânico do ultrassom e do fluxo da água altera as camadas estruturais do epitélio da MAH, favorecendo a desepitelização.

Na amostra O3 da Figura 9 (c), nota-se a ausência e destruição de algumas células epiteliais, indicadas pela seta (1.c). Mesmo com as alterações no tecido epitelial, a membrana basal permaneceu inalterada, como mostrado pela seta (2.c). As alterações vistas na amostra O3, mostram a remoção do epitélio em algumas regiões da MAH (3.c). Como indicado pela seta (4.c), nota-se que a membrana apresentou uma pequena alteração na disposição das fibras de colágeno no estroma.

Na Figura 9 (d) da amostra US_O3, foi possível perceber pequenas alterações na camada epitelial. Contudo, em poucas áreas as células epiteliais sofreram deformação estrutural, como indicado pela seta (1.d), e a membrana basal, seta (2.d), ficou preservada. Das amostras, foi a que apresentou uma menor área de remoção das células epiteliais (3.d). Observa ainda que as fibras de colágeno no estroma, aparentemente ficaram mais dispersas, como mostrado pela seta (4.d), contudo não modificaram a sua estrutura fundamental.



Legenda: (a) IN - Controle *in natura*. (b) US-Processada com ultrassom em meio líquido. (c) O3-Processada com água ozonizada. (d) US_O3-Processada com água ozonizada associada ao ultrassom. As setas (1.a), (2.b), (1.c) e (1.d) indicam as células epiteliais. As setas (2.a), (3.b), (2.c) e (2.d) indicam a membrana basal. As setas (4.d), (3.c) e (3.d) indicam as áreas com remoção das células epiteliais. As setas (3.a), (1.b), (4.c) e (4.d) indicam o estroma.

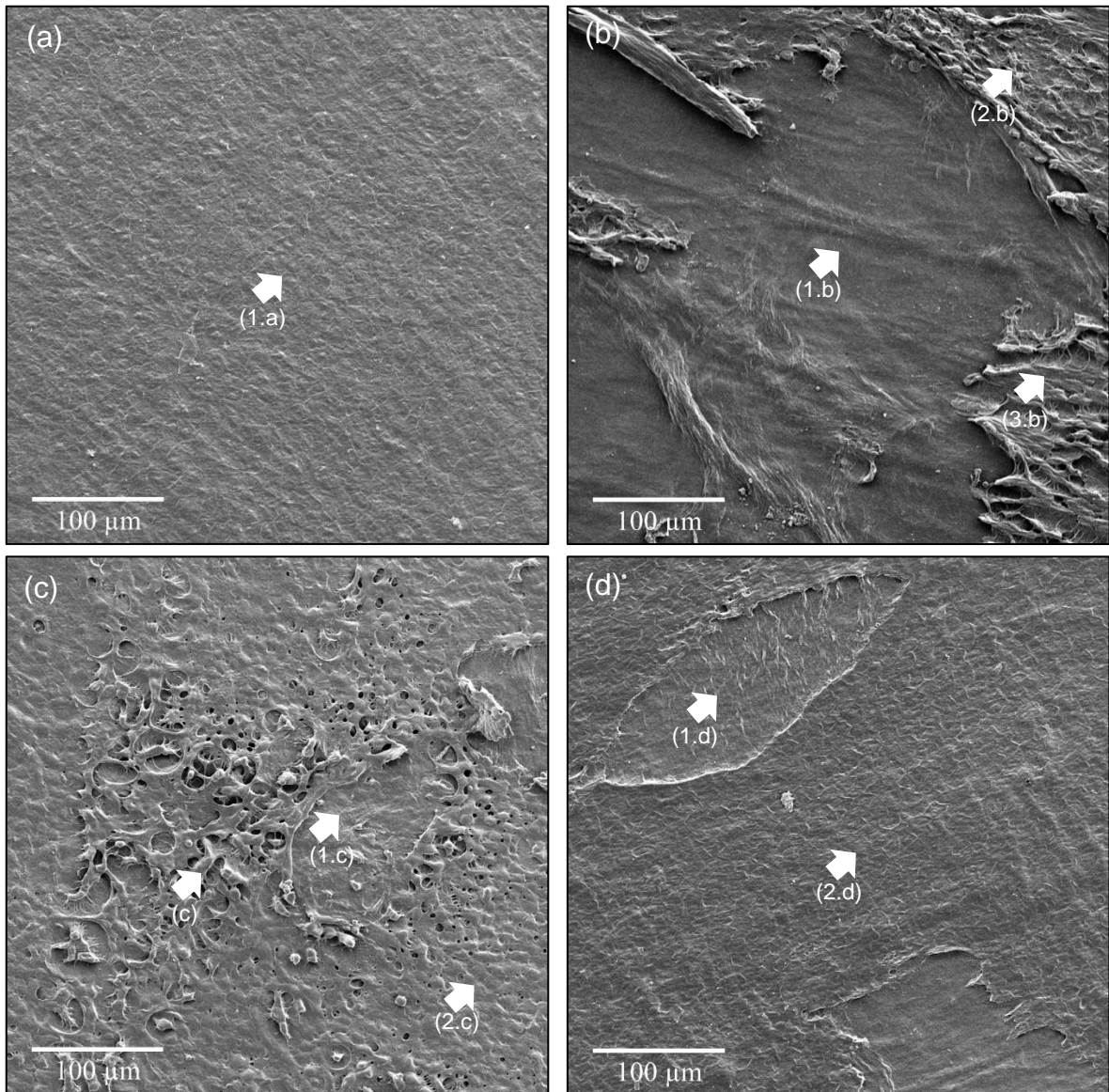
Figura 9. Imagens histológicas das amostras do experimento.

Fonte: Própria do autor.

5.5 ANÁLISE POR MEV-FEG

As imagens das amostras, obtidas por MEV-FEG são apresentadas na Figura 10. Observa-se que as estruturas visualizadas corroboram com as da Figura 9. Na Figura 10 (a), a amostra IN é visualizada com a sua camada epitelial claramente definida pela nitidez das células epiteliais, poligonais, aderidas uniformemente, caracterizando um padrão de superfície regular, com espaços intercelulares claramente definidos, indicados pela seta (1.a).

A Figura 10 (b), da amostra US, observa-se a remoção do epitélio em uma extensa área da MAH (1.b) e poucas regiões com a presença de células epiteliais, caracterizadas por uma superfície irregular, como indicado pelas setas (2.b) e (3.b).



Legenda: (a) IN-Controle/*in natura*. (b) US-Processada com ultrassom em meio líquido. (c) O3-Processada com água ozonizada. (d) US_O3-Processada com água ozonizada associada ao ultrassom. Setas (1.a), (2.c) e (1.d), mostram as células epiteliais, integras. As setas (2.b), (3.b) e (3.c) células epiteliais irregulares. Setas (1.b), (1.c) e (2.d) regiões com remoção das células epiteliais.

Figura 10. Imagens obtidas por MEV-FEG das amostras do experimento.

Fonte: Própria do autor.

Na amostra O3, na Figura 10 (c) fica evidente que, em algumas regiões, o epitélio cuboide foi removido (1.c), enquanto em outras permanece íntegro (2.c). É possível notar, uma área da superfície da MAH apresentando uma rugosidade e sobreposição das células epiteliais (3.c). Quando verificada a amostra O3_US, na Figura 10 (d) é possível identificar que o tecido epitelial sofreu alterações morfológicas, contudo em uma extensa área as células epiteliais permaneceram integras (1.d) e áreas com remoção do tecido epitelial (2.d).

Quando comparada a amostra US com as demais, é possível perceber na análise histológica e MEV-FEG, que está apresentou-se mais promissora no processo de desepitelização. Como a amostra O3_US não teve o resultado esperado, foi levantada a hipótese de que as bolhas geradas pelo O₃ estavam influenciando no efeito da cavitação do ultrassom.

5.6 CONFIRMAÇÃO DA HIPÓTESE LEVANTADA APÓS O EXPERIMENTO

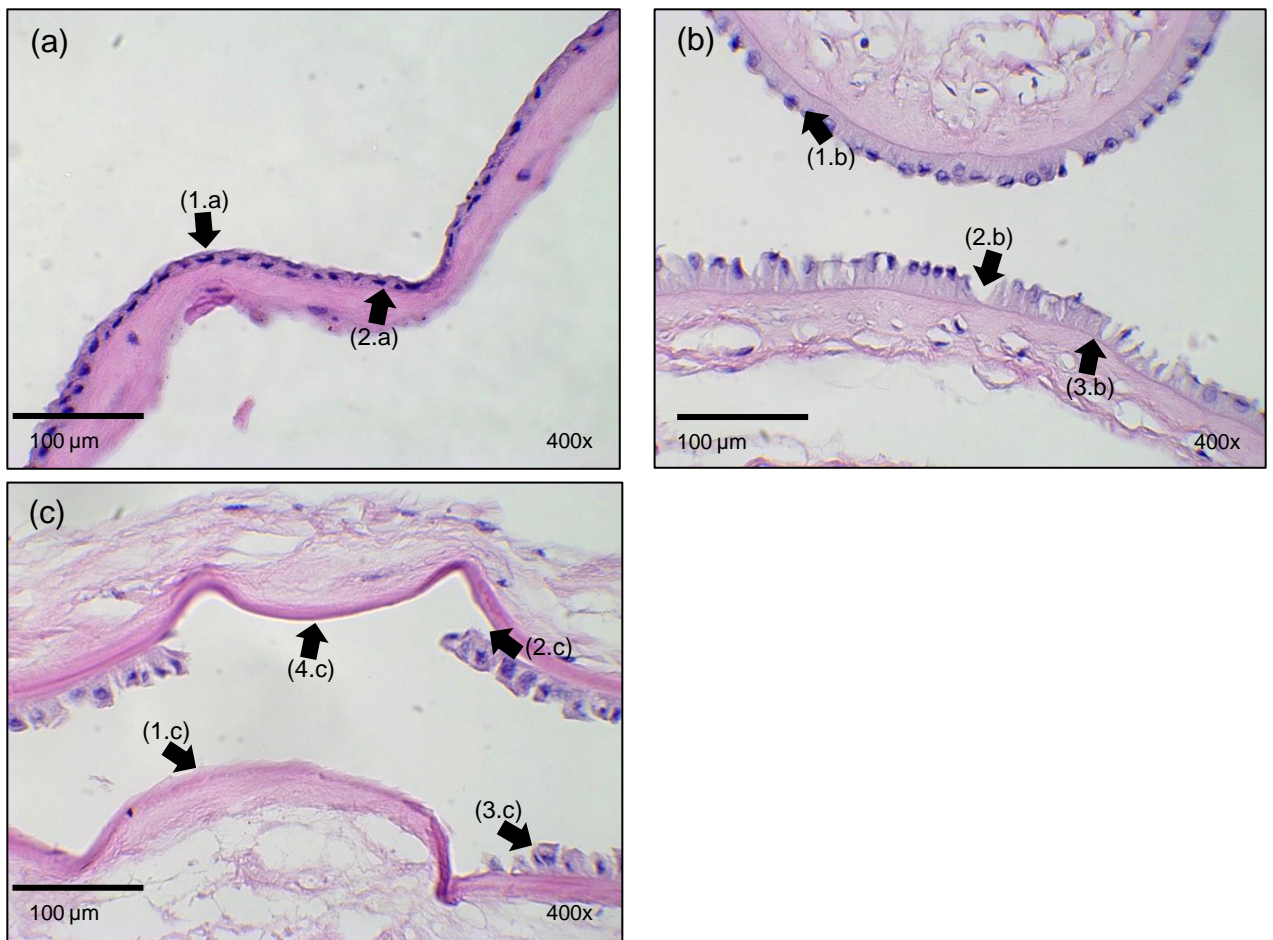
Para testar a hipótese, mais três amostras foram preparadas. Uma, controle e duas que foram processadas no sistema por 55 min. Uma amostra foi processada com a oferta de O₂ associado ao ultrassom e outra com a ação do ultrassom. Ao finalizar os experimentos, foi realizada a análise histológica, conforme apresentado na Figura 11.

Na Figura 11 (a), da amostra IN, indicada pela seta (1.a) é possível notar a presença das células epiteliais no formato cuboide aderidas umas às outras e na seta (a.2) a presença da membrana basal. Quando analisada, a imagem histológica da amostra O2_US, na Figura 11 (b), é possível perceber áreas com integridade do tecido epitelial indicado pela seta (1.b) e áreas com alterações estruturais nas bordas das células indicado pela seta (2.b) e a seta (3.b) indica a membrana basal íntegra.

Quando vista a imagem da amostra US, na seta (1.c) é possível perceber áreas totalmente desepitelizadas, bem como um descolamento homogêneo da camada de tecido epitelial apontando pela seta (2.c), com a presença de algumas células, mas todas com alterações estruturais e com a presença da membrana basal, indicadas pelas setas (3.c) e (4.c) respectivamente.

Portanto, fica evidente que os resultados encontrados estão com consonância com os achados do experimento inicial. Podendo sugerir, que as bolhas geradas pelo

sistema, seja de O₂ ou O₃, alteram os efeitos vibracionais e o da cavitação do ultrassom no processo de remoção das células epiteliais da MAH.



Legenda: (a) IN-Controle *in natura*. (b) O₂_US-Processada com água, oxigênio e ultrassom. (c) US-Processada com ultrassom em meio líquido. As setas (1.a), (1.b) e (3.c) indicam as células epiteliais. As setas (2.a), (3.b) e (4.c) indicam a membrana basal. As setas (2.b), (1.c) e (2.c) indicam as áreas com remoção das células epiteliais.

Figura 11. Imagens histológicas das amostras processadas no sistema para confirmação de hipótese.

Fonte: Própria do autor.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo a MAH foi caracterizada, após processamento em um sistema hidrodinâmico desenvolvido com água ozonizada e ultrassom. Foi percebido que quando utilizado o sistema US, é provocado um efeito de desepitelização da membrana. Uma vez que os métodos tradicionais de desepitelização acarretam

alterações no estroma da membrana (Ferenczy; Souza 2020) e diferenças espectrais (Milyudin *et al.*, 2023), o sistema utilizado neste estudo apresenta resultados promissores no processamento da MAH.

No que se refere a utilização do ultrassom para desepitelização da MAH, usualmente é utilizado o banho ultrassônico de baixa frequência (24–40 kHz) combinada a glicerol e/ou liofilização. Nestes métodos é possível perceber diferenças espectrais entre si (Milyudin *et al.*, 2023), já os espectros do presente estudo apresentaram similaridade entre si, principalmente quando comparado o da amostra IN com a amostra processada com ação do ultrassom.

Quando se trata de engenharia de tecidos, a matriz extracelular é de fundamental importância para resultado das respostas clínicas (Ahmed *et al.*, 2024). Um estudo que realizou o processamento da membrana com gentamicina e exposição ultravioleta, foi percebida a remoção das células epiteliais, contudo houve divisão das fibras de colágeno (Cavalu *et al.*, 2021).

A desepitelização da MAH com tripsina, EDTA e termolisina não remove por completo as células epiteliais e a dispase leva a fragmentação do estroma (Daniele *et al.*, 2022), fatos que também foram vistos na histologia e MEV-FEG deste estudo das amostras processadas com O₃ isolado e associado ao ultrassom, onde foi possível perceber a presença de células epiteliais e deformação estrutural do tecido. Notavelmente, a amostra submetida ao sistema hidrodinâmico com ultrassom, apresentou uma menor quantidade de células epiteliais e um estroma mais denso, quando comparada as demais. As demais amostras, apresentaram alteração na disposição das fibras de colágeno do estroma.

Awoyama *et al.* (2022), utilizaram um sistema hidrodinâmico desenvolvido com água ozonizada e notaram pequenas alterações morfológicas na camada epitelial da MAH. Neste sentido, os resultados da amostra O₃ foram similares aos do estudo citado anteriormente. Podendo observar que a água ozonizada modifica o formato e remove pequenas áreas da camada epitelial.

Um estudo recente, que também utilizou ozonização, verificou que as células epiteliais apresentaram alterações estruturais, e quanto maior o tempo de exposição menor se torna a espessura média do epitélio (Botelho *et al.*, 2024). No presente estudo foram observadas alterações na estrutura da superfície das células, tornando-a com uma espessura irregular e sem forma definida.

Não foi encontrado na literatura um estudo que utilize a ação hidrodinâmica da água e ultrassom. O que foi encontrado utilizou o banho ultrassônico de baixa frequência, que foi observada a remoção do epitélio em algumas áreas da membrana, mas também danos significativos à camada epitelial com descamação da membrana basal, exposição do estroma e formação de arquitetura trabecular (Milyudin et al., 2023).

Diferentemente do estudo de Milyudin et al. (2023), os resultados apresentados neste trabalho, utilizando um sistema com velocidade média da água de 2 cm/s, que, quando combinado com cavitação ultrassônica, pode ter potencializado os efeitos de desepitelização, preservação do estroma e propriedades bioquímicas do MAH.

Menos alterações no epitélio foram observadas na amostra US_O3 do que nas amostras O3 e US. Isso pode ser atribuído às bolhas presentes no meio líquido, que podem interferir nos efeitos vibracionais e na cavitação ultrassônica.

Água, bolhas e o MAH têm densidades diferentes, a onda ultrassônica inicialmente reflete nas bolhas devido à sua menor densidade. Como resultado, tanto as bolhas quanto as ondas ultrassônicas reduzem sua interação com o MAH. Como há uma diferença na impedância acústica entre os materiais, essa diferença leva à maior ou menor reflexão das ondas sonoras (HUANG *et al.*, 2021).

A principal limitação relacionada ao desenvolvimento do estudo está no fato de que foi utilizado material biológico fresco doado por voluntárias saudáveis, o que representou desafios na obtenção das amostras.

7. CONCLUSÃO

Após o processamento da MAH no sistema, é possível concluir que, os espectros de FT-IR mostraram mudanças sutis, como pequenos deslocamentos e alterações de intensidade nas bandas, indicando que não houve mudanças significativas nas propriedades físico-químicas da MAH após o experimento. O ultrassom teve maiores efeitos na desepitelização, e o ozônio, apesar de causar efeitos semelhantes, não superou o ultrassom. No caso da água ozonizada combinada com o ultrassom, não foram observadas alterações significativas na estrutura do tecido epitelial. Neste sentido, a cavitação causada pelo ultrassom

promoveu a desepitelização da MAH, sem alterações significativas no estroma. Os resultados indicam que o sistema tem grande potencial no processamento de MAH. Ele é mais vantajoso que os métodos tradicionais na preservação do estroma, acelera a desepitelização e não tem impacto ambiental.

Os resultados obtidos no presente estudo são promissores e é necessário que novos estudos sejam realizados utilizando este sistema para avaliar outros possíveis usos. A partir disso, será possível verificar suas vantagens em termos de desinfecção e esterilização ao usar água ozonizada e desepitelização com ultrassom, definindo o melhor protocolo completo de processamento da MAH.

REFERÊNCIAS

ABINAYA, K.; MUTHU KUMAR, B.; AHILA, S. C. Evaluation of Surface Quality of Silicone Impression Materials after Disinfection with Ozone Water: An In vitro Study. **Contemp Clin Dent**, v.9, n.1, p.60-64, 2018.

AHMED, K.; et al. Assessment of the proteome profile of decellularized human amniotic membrane and its biocompatibility with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. **J Biomed Mater Res A**, v.112, n.7, p.1041-1056, 2024.

ALBRIGHT, M.; GUTTENBERG, M. A.; TIGHE, R. M. Ozone-Induced Models of Airway Hyperreactivity and Epithelial Injury. **Methods Mol Biol**, v.2506, p.67-81, 2022.

ASHOURI, Shahrzad et al. Decellularization of human amniotic membrane using detergent-free methods: Possibilities in tissue engineering. **Tissue and Cell**, v. 76, p. 101818, 2022.

AWOYAMA, S. M. et al. Disinfection of Human Amniotic Membrane Using a Hydrodynamic System with Ozonated Water. **Ozone: Science & Engineering**, v. 45, n. 1, p. 28-40, 2022.

BANDEIRA, F., YAM, G. H.; FUEST, M.; *et al.* Urea-De-Epithelialized Human Amniotic Membrane for Ocular Surface Reconstruction. **Stem Cells Transl Med**, v.8, n.7, p.620-626, 2019.

BARROS, J. J. S. Embryology and Anatomy of Placental Membranes. In: MAMEDE, A. C.; BOTELHO, M. F. **Amniotic Membrane**: Origin, Characterization and Medical Applications. New Youk London: Springer Science, 2015.

BASILE, M. *et al.* Mapping of the Human Amniotic Membrane: In Situ Detection of Microvesicles Secreted by Amniotic Epithelial Cells. **Cell Transplantation**, v. 32, 2023.

BAYARRI, B. *et al.* Can ozone inactivate SARS-CoV-2? A review of mechanisms and performance on viruses. **J Hazard Mater**, v. 415, p.125658, 2021.

BOCCI, V. **Ozone**: a New Medical Drug. Dordrecht: Ed. Springer; 2005.

BOTELHO, TS.; *et al.* Sterilization of Human Amniotic Membrane Using an Ozone Hydrodynamic System. **Ann Biomed Eng**, v.52, n.5, p.1425-1434, 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde - 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.** Brasília, 2003. Acesso em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/rdc0190_18_07_2003.html

CAI Y. *et al.* Ozone based inactivation and disinfection in the pandemic time and beyond: Taking forward what has been learned and best practice. **Sci Total Environ**, v. 862, p. 160711, 2023.

CATALDO, Franco. Ozone Degradation of Biological Macromolecules: Proteins, Hemoglobin, RNA, and DNA. **Ozone: Science & Engineering**, v.28, n.5, p.317-328, 2006.

CAVALU, S. *et al.* Nano-Scale Modifications of Amniotic Membrane Induced by UV and Antibiotic Treatment: Histological, AFM and FT-IR Spectroscopy Evidence. **Materials (Basel)**, v.14, n.4, p. 863, 2021.

CHOWDHURY, S. M.; *et al.* Ultrasound and microbubble mediated therapeutic delivery: Underlying mechanisms and future outlook. **J Control Release**, v.326, p.75-90, 2020.

DADKHAH TEHRANI, F. *et al.* A review on modifications of amniotic membrane for biomedical applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 606982, 2021.

DANIELE, E.; *et al.* Comparison of human amniotic membrane decellularisation approaches for hESC-derived RPE cells culture. **BMJ Open Ophthalmol**, v.7, n.1, p.e000981, 2022.

DCUNHA, A. R. *et al.* Human Amniotic Membrane vs Collagen in the Treatment of Superficial Second-degree Burns in Children. **Wounds**, v. 34, n. 5, p. 135–140, 2022.

DOUDI, S. *et al.* Applications of acellular human amniotic membrane in regenerative medicine. **Life Sci**, v.310, p. 121032, 2022.

ECHARTE, L. *et al.* Processing methods for human amniotic membrane as scaffold for tissue engineering with mesenchymal stromal human cells. **Cell and tissue banking**, p. 1-15, 2022.

EGOROVA, G. V. *et al.* Ozone Solubility in Water. **Moscow University Chemistry Bulletin**, v. 70, n. 5, p. 207–210, 2015.

ELKHENANY, H.; EL-DERBY, A.; ABD ELKODOUS M.; *et al.* Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge. **Stem Cell Res Ther**, v.13, n.1, p.8, 2022.

ETCHEBARNE, M. *et al.* Use of Amniotic Membrane and Its Derived Products for Bone Regeneration: A Systematic Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. May, 2021.

FARHADIHOSSEINABADI, B. *et al.* Amniotic membrane and its epithelial and mesenchymal stem cells as an appropriate source for skin tissue engineering and regenerative medicine. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. sup2, p. 431–440, 2018.

FERENCZY, P. A. VON H.; SOUZA, L. B. D. E. 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, n.1, p.71–80, 2020.

FITRIANI, N. *et al.* Application of Amniotic Membrane in Skin Regeneration. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, p. 1–22, 2023.

GUNASEKARAN, D.; *et al.* Physicochemical characterization and self-assembly of human amniotic membrane and umbilical cord collagen: A comparative study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.165, p.2920-2933, 2020.

GRDADOLNIK, J. Conformation of Bovine Serum Albumin as a Function of Hydration Monitored by Infrared Spectroscopy. **The Internet journal of Vibrational Spectroscopy**, v.6, n.1, p.6, 2002.

HE, Y.; WAN, H.; JIANG, X.; PENG, C. Piezoelectric Micromachined Ultrasound Transducer Technology: Recent Advances and Applications. **Biosensors (Basel)**, v.13, n.1, p.55, 2022.

HEINZELMANN, T. R. D. O.; *et al.* Disinfection of Surgical Instruments Using a Hydrodynamic System with Ozonated Water and Ultrasound: Preliminary Study. **Ozone: Science & Engineering**, v., n., p.1-9, 2024.

HILMY, N.; YUSOF, N. Anatomy and Histology of Amnion. In: Hilmy, N.; Yusof, N.; NATHER, A. **Human Amniotic Membrane: Basic Science and Clinical Application**. New Jersey: World Scientific, 2017.

HUA, J.; ZHOU, Z. Progress in studies on the characteristics of human amnion mesenchymal cells. **Progress Nat Sci**, v.19, n.10, p.1047–52, 2009.

HUTH, KC.; *et al.* Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. **European Journal of Oral Sciences**, v.114, n.5, p.435-440, 2006.

HUANG, Z.; ZHAO, S.; ZHANG, Y.; CAI, Z.; LI, Z.; XIAO, J.; SU, M.; GUO, Q.; ZHANG, C.; PAN, Y.; CAI, X.; SONG, Y.; YANG, J. Tunable fluid-type metasurface for wide-angle and multifrequency water-air acoustic transmission. **Research (Wash D C)**, v. 2021, p. 9757943, 2021.

IRANPOUR, S, MAHDAVI-SHAHRI N, MIRI R, *et al.* Supportive properties of basement membrane layer of human amniotic membrane enable development of tissue engineering applications. **Cell Tissue Bank**, v.19, n.3, p.357-371, 2018.

JAHANAFROOZ, Z. *et al.* Human amniotic membrane as a multifunctional biomaterial: recent advances and applications. **J Biomater Appl**, v. 37, n. 8, pp. 1341-1354, 2023.

JI, J.; YANG, L. Advances on human amniotic epithelial cells and its clinical application potential. **Acta physiologica Sinica**, v. 74, n. 1, p. 80–92, 2022.

JOHN, S.; KESTING, M. R; PAULITSCHKE, P.; STÖCKELHUBER. M.; VON BOMHARD, A. Development of a tissue-engineered skin substitute on a base of human amniotic membrane. **J Tissue Eng**, n.10, p.10:2041731418825378, 2019.

KARTHIKESH, M. S.; YANG, X. The effect of ultrasound cavitation on endothelial cells. **Exp Biol Med (Maywood)**, v.246, v.7, p.758-770, 2021.

LACORZANA, J. Amniotic membrane, clinical applications and tissue engineering. Review of its ophthalmic use. Membrana amniótica, aplicaciones clínicas e ingeniería tisular. **Revisión de su uso oftalmológico. Arch Soc Esp Oftalmol**, v.95, n.1, p.15-23, 2020.

LEAL-MARIN, S. *et al.* Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 109, n. 8, p. 1198–1215, 2021.

LI, Z.; ZOU, Q.; QIN, D. Enhancing cavitation dynamics and its mechanical effects with dual-frequency ultrasound. **Phys Med Biol**, v.67, n.8, 2022.

LIU, Q. W. *et al.* Characteristics and therapeutic potential of human amnion-derived stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 1-33, 2021.

MAHMOUD, A.; FREIRE, R. S. Métodos emergentes para aumentar a eficiência do ozônio no tratamento de águas contaminadas. **Química Nova**, v.30, n.1, p.198–205, 2007.

MAMEDE, A. C. *et al.* Amniotic membrane: From structure and functions to clinical applications. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 2, p. 447–458, 2012.

MAO, Yong *et al.* An in vitro comparison of human corneal epithelial cell activity and inflammatory response on differently designed ocular amniotic membranes and a clinical case study. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 111, n. 3, p. 684-700, 2023.

MATAFONOVA, G.; BATOEV, V. Dual-frequency ultrasound: Strengths and shortcomings to water treatment and disinfection. **Water Research**, v. 182, p. 116016, 2020.

MCCARUS, S. D.; PARNELL, L. K. S. The Origin and Evolution of the HARMONIC® Scalpel. **Surg Technol Int**, v.35, p.201-213, 2019.

MELO, G. B. DE.; *et al.* Avaliação morfológica de diferentes técnicas de desepitelização da Membrana Amniótica Humana. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.70, n.3, p.407–411, 2007.

MILLER, RJ; KORN, RJ; MILLER, R. J. The Use of a Dehydrated, Deepithelialized Amnion-Chorion Membrane in Guided Bone Regeneration Involving Staged Implant Placement: Case Series with a 5-Year Follow-up. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v.41, n.5, p.657-662, 2021.

MILYUDIN, E. *et al.* Amniotic Membrane Biopolymer for Regenerative Medicine. **Polymers (Basel)**, v.15, n.5, p.1213, 2023.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **The Developing Human: Clinically Oriented Embryology**. 10th ed. Elsevier, 2016.

MUNOZ-TORRES, J. R. *et al.* Biological properties and surgical applications of the human amniotic membrane. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, n. January, p. 1–20, 2023.

MURPHY, S. R.; *et al.* Ozone-induced airway epithelial cell death, the neurokinin-1 receptor pathway, and the postnatal developing lung. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.307, n.6, p.L471-L481, 2014.

NIKNEJAD, H.; PEIROVI, H.; JORJANI, M.; AHMADIANI, A., GHANAVI, J.; SEIFALIAN, A. M. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **European Cells and Materials**, v.15, p.88-99, 2008.

PASSOS, T. M.; *et al.* Comparative analysis of ozone and ultrasound effect on the elimination of *Giardia* spp. cysts from wastewater. **Ozone: Science & Engineering**, v.36, n.2, p.138-143, 2014.

ROMARY, D. J.; *et al.* Liquid ozone therapies for the treatment of epithelial wounds: A

systematic review and meta-analysis. **International Wound Journal**, v.20, n.4, p.1235-1252, 2023.

ROIU, G.; et al. Assessment of antibiotic influence on structural modifications of amniotic membrane by FT-IR spectroscopy. **Materiale Plastice**, v.57, n.2, p.191-198, 2019.

RIAU, A. K.; BEUERMAN, R. W.; LIM, L. S.; MEHTA, J. S. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. **Biomaterials**, v.31, n.2, p.216-225, 2010.

ŞAPTE, E. *et al.* Histological, immunohistochemical and clinical considerations on amniotic membrane transplant for ocular surface reconstruction. **Rom J Morphol Embryol**, v. 58, n. 2, p. 363-369, 2017.

SMITH, N. L.; *et al.* Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Med Gas Res**, v.7, n.3, p.212-219, 2017.

SRIPRIYA, R.; KUMAR, R. Denudation of human amniotic membrane by a novel process and its characterisations for biomedical applications. **Prog Biomater**, v.5, n.3-4, p.161-172, 2016.

STOLARSKI, R. S. History of the Study of Atmospheric Ozone. **Ozone: Science & Engineering**, v.23, n.6, p.421–428, 2001.

TALARI, A. C.S.; et al. Advances in Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.52, n.5, p.456-506, 2017.

TEENAN, O.; *et al.* Sonoporation of Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells In Vitro to Enhance the Liberation of Intracellular miRNA Biomarkers. **Ultrasound Med Biol**, v.48, n.6, p.1019-1032, 2022.

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.

VAHEB, M. *et al.* Evaluation of Dried Amniotic Membrane on Wound Healing at Split-Thickness Skin Graft Donor Sites: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-blind Trial. **Advances in Skin and Wound Care**, v. 33, n. 12, p. 636–641, 2020.

WANG, S.; *et al.* Degradation of malathion and carbosulfan by ozone water and analysis of their by-products. **J Sci Food Agric**, v.102, n.15, pp.7072-7078, 2022.

WEIDINGER, A.; *et al.* Sub-Regional Differences of the Human Amniotic Membrane and Their Potential Impact on Tissue Regeneration Application. **Front Bioeng Biotechnol**, v.8, p.613804, 2021.

WEN, Z.; *et al.* Ultrasound meets the cell membrane: for enhanced endocytosis and drug delivery. **Nanoscale**, v.15, n.33, pp.13532-13545, 2023.

YASUI, K. Production of O Radicals from Cavitation Bubbles under Ultrasound. **Molecules**, v.27, n.15, p.4788, 2022.

YILMAZ, M. M; AKDERE, Ö. E; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M.; *et al.* Biological nerve conduit model with de-epithelialized human amniotic membrane and adipose-derived mesenchymal stem cell sheet for repair of peripheral nerve defects. **Cell Tissue Res**, v.391, n.3, p.505-522, 2023.

ZHANG, Hengdi *et al.* Human amniotic membrane graft for refractory macular hole: A single-arm meta-analysis and systematic review. **Journal Français d'Ophtalmologie**, 2023.